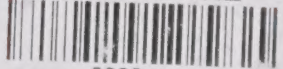


CFTRI-MYSORE



2896

Die proteine im.

TM



Angewandte Brauwissenschaft
Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiete der Bierbrauerei

Band 9

**DIE PROTEINE
IM WERDEGANG DES BIERES**

von

Prof. Dr. Ing. habil. Heinrich Lüers

VERLAG HANS CARL / NÜRNBERG

DIE PROTEINE IM WERDEGANG DES BIERES

von

Dr. Ing. habil. Heinrich Lüers

o. Professor a. D. und Direktor i. R.
der Wissenschaftlichen Station für
Brauerei in München



VERLAG HANS CARL / NÜRNBERG

2896

F8, 32962; a 06; T
N49

CFTRI-MYSORE



2896

Die proteine im...

Alle Rechte vorbehalten
Copyright 1949 by Verlag Hans Carl, Nürnberg
Druck: E. C. Baumann KG. Kulmbach
Printed in Germany 1949. 1. Auflage

VORWORT

Der Stickstoff macht nur rund 1 Prozent des Bierextraktes aus, tritt also quantitativ gegenüber Kohlehydraten, Alkohol und anderen Stoffen stark in den Hintergrund. Aber trotz dieser Tatsache spielen höher und niedriger molekulare Stickstoffverbindungen im Bier für dessen Eigenschaften eine über ihre Quantität weit hinausgehende Rolle, die z. B. für Vollmundigkeit und Schaumhaltigkeit eine günstige, für die physikalisch-chemische Stabilität unter Umständen eine recht ungünstige sein kann.

Die Erkenntnis der Bedeutung der Stickstoffsubstanzen für die Eigenschaften des Bieres wurde im Laufe dieses Jahrhunderts durch eine große Anzahl wissenschaftlicher und technologischer Studien und Versuche in fortschreitendem Maße ausgebaut und gefestigt, wobei es nicht ausblieb, daß die Meinungen oft heftig einander widersprachen. Es sei nur an die in den ersten beiden Jahrzehnten unseres Jahrhunderts die Gemüter eifrig beschäftigende „Eiweißfrage“ erinnert.

Mit der Vervollkommnung chemischer, physikalisch-chemischer und kolloidchemischer Arbeitsmethoden auf dem Gebiete der Proteine ist allmählich eine Beruhigung eingetreten. Die Probleme wurden schärfer umrissen und klarer gestellt. Ihre Lösung hat gerade in den letzten Jahren hauptsächlich durch die unermüdliche Arbeit ausländischer Forscher derartige Fortschritte gemacht, daß die „Eiweißfrage“ in großen Zügen heute deutlich zu überblicken ist und nur noch einige Spezialgebiete einer gründlichen Bearbeitung harren.

Bei dieser Sachlage erschien es gerechtfertigt und auch wünschenswert, in Form einer Monographie den Werdegang der Proteine von der Gerste über Mälzerei und Sudhaus, durch Gär- und Lagerkeller bis zum fertigen Bier darzustellen. Damit soll dem Leser die Möglichkeit geboten werden, das interessante und für die Praxis wich-

tige Teilgebiet der Brauerei, das in der Literatur des In- und Auslandes weit verstreut und manchmal schwer zugänglich ist, einerseits zusammengefaßt vorzufinden und andererseits durch Verfolgung einer einheitlichen Linie durch die Vielheit des angesammelten Materials, über das der Einzelne nur bei eingehendem Studium sich ein klares Urteil zu bilden vermag, sich hindurchgeleitet zu fühlen.

Dem eigentlichen das gestellte Thema behandelnde Teil hat der Verfasser einen allgemeinen Teil vorangestellt, in welchem er den Leser mit den Proteinen von verschiedenen Gesichtspunkten aus vertraut zu machen sucht und damit ein leichteres Verständnis für vieles, im besonderen Teil Gebrachtes zu schaffen hofft.

Möge das vorliegende Buch Interesse bei den Fachkreisen finden und ihnen auch für ihre praktische Arbeit ein Ratgeber sein.

Oberhof/Rottach-Egern

Der Verfasser.

Inhaltsübersicht

I. Teil: Allgemeines über Proteine.

A. Eigenschaften und Beschreibung des Proteine.

1. Definition und Bedeutung — 2. Eigenschaften — 3. Elementare Zusammensetzung und Bestimmung — 4. Fällungsreaktionen — 5. Farbreaktionen — 6. Denaturierung.

B. Die Hydrolyse der Proteine.

1. Totalhydrolyse mit Säuren oder Alkalien — 2. Hydrolyse der Proteine durch Enzyme.

C. Konstitution der Proteine.

1. Die Verknüpfung der Aminosäuren, die Peptidbindung --
2. Gesetzmäßigkeiten in der Anordnung der Aminosäuren.

D. Proteine als hochmolekulare Stoffe.

1. Bindungskräfte im Proteinmolekül — 2. Physikalische Chemie, Molekulargewicht (Teilchengröße) — 3. Elektrolytische Dissoziation — 4. Säure- und Basenbindung — 5. Verhalten der Proteine im elektrischen Strom.

E. Proteine als Kolloidelektrolyte.

1. Donnan-Gleichgewicht und Membranpotentiale — 2. Osmotischer Druck — 3. Viskosität — 4. Quellung — 5. Proteine und Neutralsalze — 6. Proteinkomplexe — 7. Zusammenfassung: Theorie der Elektrolytwirkung auf Proteine.

F. Einteilung der Proteine.

1. Einfache Proteine
 - a) Albumine, b) Globuline, c) Prolamine, d) Protamine und Histone, e) Gerüstproteine.

2. Zusammengesetzte Proteine oder Proteide

- a) Phosphorproteide, b) Nucleoproteide, c) Glycoproteide,
- d) Chromoproteide.

Literatur zum allgemeinen Teil.

II. Teil: Die Proteine im Werdegang des Bieres.

A. Rohmaterialien.

a) Die Gerste.

1. Die Proteinindividuen und ihre Charakterisierung. 2. Verteilung der Proteine im Korn; quantitative Verhältnisse.
3. Proteingehalt und Eigenschaften des Gerstenkornes. 4. Proteingehalt und Sorteneigenschaften; Boden, äußere Faktoren.
5. Proteine bei der Reifung und Keimreife der Gerste.

b) Hopfen.

B. Mälzerei.

a) Weiche

b) Keimung

1. Die proteolytischen Enzyme der keimenden Gerste. 2. Der Eiweißabbau beim Mälzen. 3. Die Beurteilung der Proteinlösung.

c) Darren

1. Veränderungen der Stickstoffverbindungen beim Darren.
2. Die Melanoidinreaktion. 3. Proteolytische Enzyme, Dispersitätsgrad der Proteine und Ausdarrungsgrad. 4. Malzkeime.

d) Spezialmalze

C. Sudhaus.

a) Maischprozeß

1. Allgemeines über den Eiweißabbau. 2. Stickstoffdifferenzierungsmethoden. 3. Der Proteinabbau beim Maischen.

b) Abläutern; Treber

c) Würzekochen

1. Koagulation der Proteine. 2. Eiweiß und Gerbstoff. 3. Eiweiß und Hopfenbitterstoffe. 4. Würzekochen und Melanoidinreaktion.

d) Kühlen der Würze

1. Aufnahme von Sauerstoff. 2. Trubabscheidung (Kühltrub-Kältetrübung).

e) Zusammensetzung der Würze

D. Die Gärung

- a) Allgemeines über die Bedeutung des Stickstoffs für den Stoffwechsel der Hefe.
 - 1. Die Stickstoffquellen und ihre Assimilierbarkeit. 2. Wachstumsstoffe. 3. Stickstoffaufnahme durch die Hefe; Einfluß der N-Konzentration.
- b) Die Gärung in der Praxis.
 - 1. Die Stickstoffverhältnisse bei der Gärung. 2. Deckenbildung, kolloide Ausscheidungen. 3. Säurezunahme bei der Gärung: Ester, höhere Alkohole. 4. Degenerierung und Regenerierung der Hefe; anormale Gärung. 5. Lagerung des Bieres. 6. Filtration.

E. Das fertige Bier.

- a) Eiweißtrübungen,
 - 1. Reine Eiweißtrübung. 2. Kältetrübung. 3. Oxydations-trübung. 4. Metalleiweißtrübung.
- b) Schaumhaltigkeit, Vollmundigkeit.
- c) Zusammensetzung des Bieres.

Anhang. Proteine und Stickstoffverbindungen der Hefe.

Literaturverzeichnis.

I. Teil:

Allgemeines über Proteine

A. Eigenschaften und Beschreibung der Proteine

1. Definition und Bedeutung.

Die Proteine stellen weitaus die wichtigste materielle Grundlage alles pflanzlichen und tierischen Lebens dar. Aus dieser Erkenntnis heraus erhielten sie ihren Namen Proteine vom griechischen *πρωτειν* d. h. den ersten Platz einnehmen. Die ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung Eiweißstoffe oder kurzweg Eiweiß leitet sich vom Weißen des Hühnereies ab, das seit langer Zeit als Prototyp der ganzen Klasse angesehen wurde.

Als Träger prosthetischer Gruppen in den Enzymen nehmen die Proteine am Geschehen des Lebens jeder einzelnen Zelle entscheidenden Anteil. Die Gene als Träger der Erbfaktoren in den Chromosomen sind im wesentlichen Proteine, die Virusarten als Vertreter submikroskopischer Lebenseinheiten stellen Riesenmoleküle von Proteinnatur dar. Mit diesen wenigen Tatsachen mag die große biologische Bedeutung der Proteine genügend angedeutet sein und es wird damit auch verständlich, warum unter den Hauptnahrungstoffen: Kohlehydrate, Fette und Proteine den letzteren eine überragende Bedeutung für den Stoffwechsel des Organismus zukommt.

2. Eigenschaften.

Die Proteine sind organisch-chemische Verbindungen von sehr hohem Molekulargewicht und gehören wie Stärke, Glycogen, Cellulose, Gummikörper u. a. zu den hochpolymeren Naturstoffen. An ihrem Aufbau sind immer Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff, meist auch Schwefel, in manchen Fällen auch Phosphor und seltener andere Elemente beteiligt.

Entsprechend ihrem hohen Molekulargewicht sind die Eiweißstoffe Kolloide und treten dementsprechend im Organismus, wenn sie löslich sind als Sole, wenn unlöslich als Gele auf. Der kolloide Zustand bedingt auch, daß sie nur ein sehr geringes Diffusionsvermögen besitzen und durch tierische Membranen kaum merklich, durch künstliche Pergamentmembranen überhaupt nicht zu wandern vermögen. Da die Proteine organische Gruppen tragen, welche der elektrolytischen Dissoziation fähig sind z. B. Amino (NH_2 —) und Carboxyl (COOH —) Gruppen, besitzen sie in wässriger Lösung elektrische Ladung, die je nach der Art des umgebenden Milieus nach Stärke und Vorzeichen verschieden sein kann. Mit der elektrischen Ladung hängt auch die Quellbarkeit oder Hydratation der Proteine zusammen. Ladung und damit Quellung sind sehr leicht von physikalischen und chemischen Milieufaktoren beeinflussbar, woraus sich die äußerst leichte Veränderlichkeit der Erscheinungsformen und der Stabilität von Proteinen in Lösung erklärt.

In trockenem, festen Zustand sind die meisten Proteine amorph, einige wurden auch in kristallisiertem Zustand aus den Lösungen erhalten, wobei zwischen den üblichen Kristallen der anorganischen und organischen Substanzen und den Proteinkristallen der Unterschied besteht, daß die letzteren in Wasser Quellungserscheinungen zeigen und kein Linienröntgenogramm besitzen. Sie zeigen also nur die äußere Erscheinungsform der Kristalle, sind ihrer Struktur nach aber als amorph anzusprechen.

In ihren Löslichkeitseigenschaften zeigen die Proteine sehr große Verschiedenheiten. Es gibt solche, welche in reinem destilliertem Wasser löslich sind (Albumine), solche, welche in Wasser erst bei Gegenwart bestimmter Neutralsalzkonzentrationen löslich werden und beim Wegdialysieren der Salze sich wieder unlöslich abscheiden (Globuline). Andere lösen sich weder in Wasser noch in Salzlösungen, dagegen in verdünnten Alkalien oder Säuren (Glutelin, Casein). Eine in den Cerealien vorkommende Gruppe von Proteinen, die Prolamine sind dadurch ausgezeichnet, daß sie in etwa 70%igem Alkohol gut löslich sind, dagegen beim Verdünnen oder Konzentrieren sich unlöslich abscheiden. Schließlich gibt es auch Proteine z. B. die Skleroproteine (Horn, Nägel, Haare), welche normalerweise unlöslich sind und erst durch energisch wirkende chemische Agentien z. B. stärkere Säuren oder Alkalien in der Hitze, dann allerdings unter tiefgreifendem Abbau (Hydrolyse) in Lösung gebracht werden können.

Von sonstigen Eigenschaften der Proteine sind noch zu erwähnen: ihre optische Aktivität, die bei allen Proteinen durch eine mehr oder

minder große Linksdrehung charakterisiert ist. Ferner ihr Lichtabsorptionsvermögen, das jedoch erst im ultravioletten Bereich charakteristische Absorptionsbanden aufweist. Und schließlich die Fähigkeit vieler löslicher Proteine, die Oberflächenspannung zu erniedrigen, womit das Vermögen der Schaumbildung und der Bildung der verschiedensten Adsorptionsverbindungen von Eiweißlösungen zum Teil seine Erklärung findet.

3. Elementare Zusammensetzung u. Bestimmung.

Die elementare Zusammensetzung der Proteine ist im allgemeinen nur geringen Schwankungen ausgesetzt, wie folgende Übersicht zeigt:

Kohlenstoff	49,83 bis 54,31 %
Wasserstoff	6,65 „ 7,77 %
Stickstoff	15,00 „ 18,88 %
Schwefel	0,78 „ 2,25 %
Phosphor	0,85 „ 0,88 %

Die pflanzlichen Proteine der gleichen Gruppe z. B. Albumine enthalten jeweils 1—2% Stickstoff mehr als die tierischen.

Der durchschnittliche Stickstoffgehalt der Proteine liegt bei 16,0%. Aus diesem Grunde ist man auch dahin übereingekommen, die Proteine quantitativ derart zu bestimmen, daß man den analytisch ermittelten Stickstoffgehalt mit dem Faktor $6,25 = \frac{100}{16}$ multipliziert. Man muß sich jedoch immer darüber im Klaren sein, daß man damit mehrfache Fehler und Ungenauigkeiten begeht, insofern als der Stickstoffgehalt der Proteine eben nicht genau 16% beträgt und ferner in proteinhaltigen Naturprodukten immer ein mehr oder weniger großer Teil des Stickstoffs nicht als Proteinstickstoff vorliegt. Deshalb pflegt man den durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffgehaltes mit 6,25 erhaltenen Proteingehalt zweckmäßig als „Rohprotein“ zu bezeichnen.

Die analytische Ermittlung des Proteinstickstoffs erfolgt nach der allbekannten Kjeldahl'schen nassen Verbrennungsmethode mit Hilfe konzentrierter Schwefelsäure und Katalysatoren, wobei der Stickstoff zum Ammoniak reduziert wird, welches letzteres nach Überdestillieren aus alkalischer Lösung sich maßanalytisch bestimmen läßt.

4. Fällungsreaktionen.

Die Proteine lassen sich aus ihren Lösungen durch verschiedene Fällungsmittel herausfällen z. B. durch organische mit Wasser mischbare Lösungsmittel, wie Alkohol, Azeton, Dioxan. Die Wirkung solcher

Lösungsmittel z. B. des Alkohols kann als eine Dehydratisierung der Proteinmoleküle gedeutet werden, wobei lösungsvermittelnde und stabilisierende Wassermoleküle dem Protein vom Alkohol, der sich selbst sehr stark zu hydratisieren bestrebt ist, entzogen werden. Wird die Fällung des Proteins mit Alkohol sehr rasch vom Alkohol befreit und wieder in Wasser gelöst, so gelingt es meist, wieder eine unveränderte Proteinlösung zu erhalten. Bei längerer Einwirkung des Alkohols wird das Eiweiß verändert, unlöslich (siehe unten Denaturierung.)

Allgemeine Proteinfällungsmittel sind die Salze der Schwermetalle, von denen meistens jene des Eisens, Kupfers, Zinks, Quecksilbers, Bleis und des Urans, gewöhnlich in Form der Azetate, Verwendung finden. Außer zur allgemeinen Fällung finden sie auch zur differenzierenden Trennung von Proteinindividuen und deren höher molekularen Abbauprodukten (Albumosen und Peptonen) analytisch Gebrauch. Im Überschuß sowohl des Metallsalzes wie des Proteins lösen sich die Fällungen öfters wieder auf. Die Schwermetallsalzfällungen sind irreversibel und denaturieren das Protein. Darauf beruhen die Giftwirkungen von Schwermetallen auf den Organismus.

Weitere Fällungsmittel sind die sogenannten Alkaloidreagentien, nämlich Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Ferrocyanwasserstoffsäure, Pikrinsäure, die gewöhnlich in saurer Lösung verwendet werden. Von anderen Säuren haben stark fällende Wirkung: Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Salpetersäure, letztere wird zur klinischen Eiweißprobe verwandt.

Weiterhin ist die fällende Wirkung von Tannin und anderen Gerbstoffen auf Proteine bekannt, wobei je nach der chemischen Natur des betreffenden Gerbstoffes und seinem Zustand (reduzierte Form oder oxydierte Form = Phlobaphen) in den Löslichkeitseigenschaften der Eiweiß-Gerbstoffverbindungen oft beträchtliche Unterschiede auftreten können z. B. in der Hitze und Kälte unlöslich (Eiweiß-Phlobaphen), oder in der Hitze löslich, in der Kälte unlöslich. (Eiweiß-Gerbstoff).

Bekannt ist ferner die Fällung der Proteine durch Aussalzen aus ihren wässrigen Lösungen. Am gebräuchlichsten sind für diesen Zweck das Ammonsulfat oder, wenn das Ammoniumion bei quantitativen Bestimmungen stört, das Magnesiumsulfat.

Die Sättigungsgrenzen, bei welchen die einzelnen Proteine gefällt werden, sind verschieden, Globulin fallen z. B. bei 30—50%iger Sättigung, Albumin erst bei 90—100%iger Sättigung aus. Die fäl-

lende Wirkung der genannten Sulfate beruht auf der starken Hydratation des Sulfations, das dem Protein zu seiner Lösung erforderliches Hydratationswasser entreißt und damit die Phasentrennung herbeiführt. Dies ausgefällte Protein geht bei einigermaßen raschen Arbeiten in Wasser oder verdünnter Salzlösung unverändert wieder in Lösung. Zinksulfat fällt nicht nur Proteine, sondern auch die ihnen nahestehenden Albumosen aus, während Peptone in Lösung bleiben und mit Phosphorwolframsäure gefällt werden können.

Entsprechend ihrer elektrischen Ladung vermögen die Proteine mit entgegengesetzt geladenen Kolloiden unlösliche Niederschläge zu liefern, die jedoch teilweise im Überschuß des einen oder anderen Kolloides wieder löslich, peptisierbar sind. Mit kolloidem Ferrihydroxyd ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) erfolgt bei Elektrolytgegenwart Fällung. Mit Mastix- und Kaolinsuspension tritt ebenfalls Fällung ein, Mastix im Überschuß angewandt dient zur Enteiweißung von Lösungen auf kaltem Wege. Auch die oben erwähnte Gerbsäurefällung gehört in gewissem Sinne hierher. Schließlich vermögen sich auch zwei entgegengesetzt geladene Proteine auszuflocken z. B. basisches Protamin und saures Casein, wobei an rein chemische Salzbildung zu denken ist, oder Histon und Haemoglobin (bei alkalischer Reaktion.) Kolloide Farbstoffe geben oftmals mit Proteinen Fällungen unter gegenseitiger Entladung.

Jonenaustauschende Permutite wie Montmorillonit oder Bentonit vermögen Eiweiß aus Lösungen herauszunehmen, wovon man beim Protexverfahren zur Stabilisierung von Bier Gebrauch macht (Deglutan).

5. Farbreaktionen.

Die Farbreaktionen kommen dadurch zustande, daß das Proteinmolekül charakteristische Gruppen enthält, die mit bestimmten Reagentien Färbungen liefern. Nicht alle der im Folgenden aufgeführten Reaktionen sind für Proteine spezifisch, dies gilt streng genommen nur von der ersten, der Biuretreaktion, während die übrigen entweder auf bestimmte Gruppen spezifisch sind z. B. auf Tyrosin oder Tryptophan, sodaß bei deren Fehlen im Protein die Reaktion negativ ausfällt, ohne daß deswegen die untersuchte Substanz kein Protein zu sein bräuchte oder die Reaktion liefern auch andere Verbindungen als nur die Proteine. Im folgenden sind die gebräuchlichen Farbreaktionen nur kurz charakterisiert:

a) Biuretreaktion. Die stark mit NaOH oder KOH alkalisch gemachte Proteinlösung gibt nach Zusatz einiger Tropfen sehr ver-

dünnter Kupfersulfatlösung in der Kälte eine blaue bis rotviolette Färbung oder Fällung. Peptone eine rein rote. Empfindlichkeit bis 1 : 100 000 bei Peptonen. Niedrigere Abbauprodukte geben die Reaktion nicht mehr.

b) Die Ninhydrinreaktion. Die zu prüfende Lösung wird mit einigen Tropfen einer Lösung von Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin) 1 : 400 bei neutraler Reaktion kurz gekocht, beim Abkühlen tritt Blaufärbung auf. Alle Aminosäuren mit Ausnahme des Prolins, aber auch andere Stoffe mit freien Aminogruppen, wie Amine, Ammonsalze, Harnstoffderivate geben die Reaktion.

c) Xanthoproteinreaktion. Starke Salpetersäure wirkt auf Proteine — fest oder in Lösung — unter intensiver Gelbfärbung ein, die durch Alkalien in Rotbraun übergeht. Verantwortlich sind für die Reaktion Nitroderivate des Tyrosins und Tryptophans.

d) Millon'sche Reaktion. Mit Millon's Reagenz — einer angesäuerten nitrihaltigen Quecksilbernitratlösung gekocht, geben Proteine rosa bis dunkelrote Lösungen oder Fällungen, was auf eine Oxydation des Tyrosins zurückzuführen ist.

e) Pauli'sche Diazoreaktion. Nach Zusatz einiger Tropfen Soda-lösung, die einige Zentigramme Diazobenzolsulfosäure enthält, tritt kirschrote Färbung auf, was auf die Gegenwart von Tyrosin und Histidin zurückzuführen ist.

d) Molisch-Reaktion. Nach Zusatz von etwas alkoholischer α -Naphthollösung und Unterschichten mit konzentrierter Schwefelsäure tritt starke Violettfärbung auf, die auf der Bildung von Furfurol aus Kohlehydraten beruht. Sie würde also auf die Gegenwart von Kohlehydraten im Protein hindeuten, nachdem die Reaktion jedoch ungemein empfindlich ist, ist sie nicht spezifisch, weil auch zufällige Kohlehydratbeimengungen sie geben können.

f) Adamkiewicz — Hopkins Reaktion. Entfettetes Eiweiß in glyoxalsäurehaltigem Eisessig gelöst und mit konz. Schwefelsäure unterschichtet, gibt rotviolett oder grüngefärbten Ring, wofür Tryptophan verantwortlich ist.

g) Reaktion von Voisenet. 2 cm Eiweißlösung, 1 Tropfen 25%iges Formalin und 15 cm konzentrierte Salzsäure liefern nach 10 Minuten langem Kochen und Zugabe von 10 Tropfen 0,05%iger Natriumnitritlösung blauviolette, vom Tryptophan verursachte Färbung.

h) Schwefelbleireaktion. Beim Kochen von Eiweiß mit Lauge und einem Bleisalz entsteht braune bis schwarze Färbung von Bleisulfid. Verantwortlich schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystin.

6. Denaturierung.

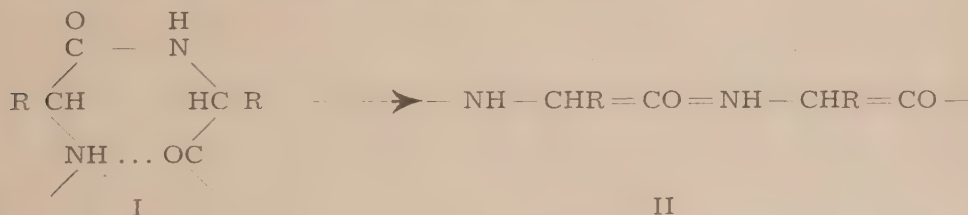
Der Zustand, in welchem sich die Proteine in pflanzlichen oder tierischen Organen befinden oder durch schonende Extraktionen mit Wasser oder Salzlösungen aus ihnen gewonnen werden können, wird als genuiner oder nativer bezeichnet. Wie bereits erwähnt sind jedoch die Proteine sehr labile Stoffe und verlieren unter verschiedenen physikalischen oder chemischen Einflüssen ihre natürliche Beschaffenheit, werden verändert und gehen in einen unlöslichen Zustand über, Vorgänge, welche man Denaturierung nennt.

Die Behandlung von Proteinen in Lösung mit organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Aceton u. dgl. oder die Fällung mit Schwermetallsalzen führt zur Denaturierung. Selbst ein einfaches längere Zeit währendes Aufbewahren von Proteinen in trocknen Zustand kann allmähliche Denaturierung bewirken. Ähnliches gilt auch für die Wirkung von Grenzflächenkräften. Schüttelt man z. B. längere Zeit Eiweißlösungen mit Luft oder mit Toluol, Chloroform, Aether u. a. so reichern sich die Proteine als oberflächenaktive Stoffe in den Grenzflächen an, wo sie allmählich sich zu unlöslich werdenden Häutchen verfestigen.

Die bekannteste Art der Denaturierung ist die Hitzegerinnung oder Koagulation der Proteine. Sie tritt ein, wenn man eine Eiweißlösung auf höhere Temperatur erhitzt und verläuft in zwei getrennten Phasen, nämlich der eigentlichen Denaturierung, einem chemischen, mit Veränderungen im Proteinmolekül vonstatten gehenden Prozeß, der noch nicht restlos überblickbar ist, wahrscheinlich aber auf Wasserabspaltung beruht, und der physikalisch bzw. kolloidchemisch zu betrachtenden Koagulation, in welcher die denaturierten Proteinteilchen sich zu sichtbaren Koagulas zusammen ballen, oder bei entsprechender Konzentration zum Gel, wie beim gekochten Ei, erstarren. Je nach den äußeren Umständen z. B. pH, Salzgehalt können beide Phasen gleichzeitig eintreten, oder aber nur die eine, nämlich die Denaturierung findet statt. Diese tritt beim Erhitzen einer Eiweißlösung auf jeden Fall ein, während die Koagulation nur bei elektrisch neutralem, sogenanntem isoelektrischem Eiweiß spontan erfolgt, nicht jedoch, wenn das Eiweiß mit Säuren oder Alkalien Salze bildet, in welchem Falle es zwar denaturiert wird, das denaturierte Protein jedoch in Lösung bleibt. Erst durch Zusatz von Salzen tritt Koagulation ein. In der Praxis koaguliert man das Eiweiß aus Gewebs- und Organextrakten, Harn und dergleichen, indem man diese etwas mit verdünnter Essigsäure ansäuert.

Die Denaturierung durch Hitze verläuft als eine Reaktion erster Ordnung und hat einen außergewöhnlichen hohen Temperaturkoeffizient. Eine Temperatursteigerung um 10° (z. B. von 50 auf 60° C) erhöht die Geschwindigkeit der Denaturierung des Gerstenalbumins „Leucosin“ um das 48 fache, während allgemein chemische Reaktionen bei der gleichen Temperatursteigerung nur eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um das 2 bis 3 fache erfahren. Daraus erklärt sich auch die Erscheinung, daß bei allmählicher Erhöhung der Temperatur einer Eiweißlösung die Gerinnung so plötzlich eintritt, daß man oft von Gerinnungstemperaturen sprach und diese fälschlicherweise für physikalische Konstanten ähnlich Schmelzpunkten oder Erstarrungspunkten hielt.

In neuerer Zeit stellt man sich den Vorgang der Denaturierung nach Hsien Wu als eine Aufhebung der spezifischen Zwitterionenstruktur des Eiweißmoleküls (siehe später elektrolytische Dissoziation der Proteine D 3) vor. Durch Sprengung der Ionenbindung kommt es bei der Denaturierung zu einer Entfaltung von Peptidketten und dann zu einer Verlagerung der im genuinen Protein im Innern des Makromoleküles gebundenen Endgruppen an die Oberfläche des Moleküles. Folgendes Formelbild gibt eine der Möglichkeiten bei der Denaturierung wieder:



In dem als Zyklol gedachten Peptidringsystem I wird die durch Punkte angedeutete assoziative Bindung aufgesprengt und dadurch die Peptidkette II gestreckt. Diese Entfaltung der Peptidketten erfolgt durch Hitze, aber auch durch Spreitung auf Flüssigkeitsoberflächen, wodurch die Schütteldenaturierung von Eiweißkörpern verständlich erscheint.

In seiner neuesten Studie über Eiweißmoleküle vertritt Pascual Jordan ähnliche Vorstellungen wie die eben entwickelten. Die Sphäroproteine wie viele Albumine und Globuline, bei denen man bisher eine Einknäuelung von Peptidketten annahm, faßt Jordan in ihrer Struktur als aufgebaut aus Tripeptolen, also ringförmigen Gebilden von drei peptidartig miteinander verbundenen Aminosäuren auf,

welche infolge von Resonanzanziehung die Eigenschaft besitzen sich zu Molekülen höherer Ordnung aneinander zu lagern. Durch den Denaturierungsvorgang öffnen sich die Peptolringe und strecken sich zu Peptidketten aus.

Da Peptolringe im Gegensatz zu Peptidketten nur von einer engbegrenzten Anzahl von Enzymen angegriffen werden, erklärt sich mit der Öffnung der Peptolringe und Streckung zu Peptidketten auch die Tatsache, daß denaturierte Proteine viel schneller von proteolytischen Enzymen abgebaut werden als native. (Siehe auch Konstitution der Proteine C 2).

Auch bei der Einwirkung verdünnter Säuren und Alkalien, langsamer in der Kälte, rasch beim Erhitzen erfolgt eine Denaturierung der Proteine. Es bilden sich Acid- bzw. Alkaliproteine, welche in Säuren bzw. Alkalien löslich sind, durch die beim Neutralisieren sich bildenden Salze oder beim Zusatz von Salzen aber koagulieren.

B. Die Hydrolyse der Proteine

1. Totalhydrolyse mit Säuren oder Alkalien.

Werden Proteine mit Säuren oder Alkalien bei gewöhnlichem Druck oder im Autoklaven genügend lange gekocht, oder auch mit überhitztem Wasserdampf behandelt, so werden sie unter Aufnahme von Wasser in ihre letzten Bausteine, die Aminosäuren gespalten. Sämtliche erhaltenen Aminosäuren sind α — Aminosäuren der l-Reihe, die Aminogruppe steht also benachbart zur Carboxylgruppe. Als Bausteine des Eiweißmoleküles wurden bis heute folgende gefunden:

a) Monoamino — monocarbonsäuren.

Glycocoll, $C_2H_5NO_2$, Aminoessigsäure (auch Glycin genannt)

Alanin, $C_3H_7NO_2$ α — Aminopropionsäure.

Valin $C_5H_{11}NO_2$ α — Aminoisovaleriansäure.

Leucin $C_6H_{13}NO_2$ α — Aminoisocapronsäure.

Jsoleucin $C_6H_{13}NO_2$ α — Amino — β — methyl — β — aethylpropionsäure.

Norleucin $C_6H_{13}NO_2$ α — Amino — n — capronsäure.

Phenylalanin $C_9H_{11}NO_2$ β — Phenyl — α — aminopropionsäure.

Tyrosin $C_9H_{11}NO_3$ β — p — oxyphenyl — α — aminopropionsäure.

Serin $C_3H_7NO_3$ β — oxy — α — aminopropionsäure.

Threonin $C_4H_9NO_3$ β — oxy — α — aminobuttersäure.

Cystin $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ Di — β — thio — α aminopropionsäure.

Methionin $C_5H_{11}NO_2S$ γ — thiomethyl — α — aminobuttersäure.

b) Monoamino — dicarbonsäuren.

Asparaginsäure $C_4H_7NO_4$ — Aminobernsteinsäure.

Glutaminsäure $C_5H_9NO_4$ α — Aminoglutarsäure.

β — oxyglutaminsäure. $C_5H_9NO_5$.

c) Diamino — monocarbonsäuren.

Arginin $C_6H_{14}N_4O_2$ α — amino — δ — guanidin — valeriansäure.

Lysin $C_6H_{14}N_2O_2$ α , ϵ — diaminocapronsäure.

d) Heterocyclische Aminosäuren.

Histidin $C_6H_9N_3O_2$ β — imidoazol — α — aminopropionsäure.

Prolin $C_5H_9NO_2$ α — Pyrrolidincarbonsäure.

Oxyprolin $C_5H_9NO_3$ — Oxypyrrolidincarbonsäure.

Tryptophan $C_{11}H_{12}N_2O_2$ β — indol — α — aminopropionsäure.

Außer diesen bekannten, mit Sicherheit nachgewiesenen Aminosäuren wurden hin und wieder noch einige wenige beobachtet, deren Natur noch nicht aufgeklärt ist. Ferner wird neben dem Cystin auch seine reduzierte Form, das Cystein unter den Hydrolysenprodukten der Proteine gefunden, sodaß anzunehmen ist, daß beide, Cystin und Cystein, im Proteinmolekül enthalten sind. Das fast regelmäßig bei der Eiweißhydrolyse auftretende Ammoniak entsteht durch Aufspaltung von Säureamidbindungen, in welcher Form Asparagin (Säureamid der Asparaginsäure) und Glutamin (Säureamid der Glutaminsäure) im Proteinmolekül enthalten sind. Aus den Gerüsteiweißstoffen wie Chitin und Mucinen (Schleimstoffen) treten noch Aminozucker z. B. Glukosamin und Chondrosamin als Spaltprodukte auf. Die bei der Hydrolyse regelmäßig in kleiner oder größerer Menge entstehenden, schwarz-braunen Huminstoffe sind teils Zersetzungsprodukte der Proteine bzw. ihrer Bausteine, teils entstehen sie besonders, wenn neben den Proteinen noch Kohlehydrate zugegen sind.

Trennung und Analyse der Aminosäuren.

Es sollen im Folgenden lediglich die Prinzipien kurz angedeutet werden, nach denen eine Trennung und Identifizierung der einzelnen Aminosäuren aus dem bunten Gemisch, als welches sie im Hydrolysat auftreten, gelingt.

Die klassische Methode ist Emil Fischers Estermethode, die darauf beruht, daß die getrockneten Aminosäuren mit Methylalkohol verestert und die erhaltenen Methylester im Vacuum einer fraktionierten Destillation unterworfen werden. Die einzelnen Fraktionen werden dann wieder zu den freien Aminosäuren verseift und diese durch Löslichkeit oder charakteristische Salze identifiziert.

Die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin, Histidin und das schwefelhaltige Cystin, die alle jeweils 6 C — Atome besitzen und deshalb Hexonbasen genannt werden, lassen sich nach Kossel durch Phosphorwolframsäure fällen und damit von den anderen Aminosäuren trennen. Ihre Bestimmung im Einzelnen gelingt nach D. D. van Slyke aus dem Gesamt- und Aminostickstoff, die des Cystins aus dem Schwefelgehalt der Hexonbasenfraktion.

Eine weitere Trennungsmethode der Aminosäuren aus neuerer Zeit stammt von H. D. Dakin, die auf einer lange dauernden Extraktion der Lösung der Aminosäuren mit n-Butyl- oder n-Propylalkohol beruht. Dabei gehen eine Reihe von Aminosäuren in den Alkohol über, aus dem sie sich z. T. unlöslich abscheiden, z. T. in Lösung bleiben, während ein anderer Teil unextrahiert in der wässrigen Lösung verbleibt.

Brozier verwendet die Löslichkeit der Kupfersalze in Methylalkohol und Wasser zur Trennung der Aminosäuren. Przylecki und Kasprzyk die Differenz ihrer Löslichkeit in niedrigen Säuren. Cherbulier acetyliert die Aminosäuren und fraktioniert die erhaltenen Ester. M. Bergmann verwendet zur Trennung der Aminosäuren teilweise spezifische Fällungsmittel (Glycocoll, Alanin, Prolin, Oxyprolin, Cystin), teils spezifische chemische Bestimmungsmethoden (Serin, Methionin, Alanin) oder kolorimetrische Verfahren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan).

In neuester Zeit wurden von Ussing (1939) und Rittenberg und Foster (1940) neuartige Methoden entwickelt, die darauf beruhen, daß die zu analysierende Aminosäure oder Aminosäurefraktion mit einer bestimmten Menge einer synthetischen Aminosäure, in die ein isotopes Element eingeführt wurde, vermischt wird. Die zu bestimmende Aminosäure wird also durch Isotopen gekennzeichnete Aminosäure verdünnt. Nach der Isolierung der betreffenden Aminosäure durch irgend eine Methode läßt sich aus dem leicht durch physikalische Methoden sehr exakt zu bestimmenden Isotopen die Menge der gesuchten Aminosäure ermitteln. Von den neueren chemischen Methoden wird diese sogenannte Isotopenverdünnungsmethode als eine der zuverlässigsten bezeichnet.

Zu allen Methoden, welche auf die Isolierung und Bestimmung der einzelnen Aminosäuren abzielen sind größere Mengen von Proteinen erforderlich z. B. nach der Fischer'schen Estermethode mindestens 100 g, meist noch mehr wegen der zur Sicherheit erforderlichen Doppelbestimmungen. Von selteneren Eiweißkörpern stehen derartige Mengen nicht zur Verfügung, ja selbst für geläufigere würden die Kosten ihrer Darstellung sehr hoch sein. Aus diesem Grunde haben Methoden viel Anwendung und Beachtung gefunden, bei welchen die verschiedenen Arten des Stickstoffs, die bei der Säurehydrolyse der Proteine auftreten, in Gruppen zusammen gefaßt, analytisch bestimmt werden. Die bekannteste dieser Methoden stammt von D. D. van Slyke, sie kommt mit etwa 3 g Protein aus und erfaßt folgende Stickstoffgruppen bzw. Aminosäuren:

1. Ammoniak — N.
2. Humin — N.
3. Arginin — N.
4. Histidin — N.
5. Lysin — N.
6. Cystin — N.
7. Amino — N.
8. Nichtamino — N

} Hexonbasen

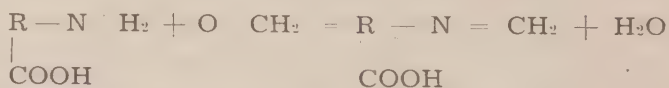
} Im Filtrat der Basen.

Nach dieser Methode sind eine große Anzahl der verschiedensten Proteine analysiert und hinreichend zuverlässig charakterisiert und klassifiziert worden.

Zur quantitativen Bestimmung des bei der Hydrolyse der Proteine in Freiheit gesetzten Aminostickstoffs stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, von denen die bekanntesten die Formoltitration nach Sørensen, die Titration nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz, sowie die gasometrische Methode von van Slyke sind.

Die Aminosäuren tragen einerseits eine „alkalische“ Aminogruppe und andererseits eine „saure“ Carboxylgruppe (oder jeweils deren mehrere). Sie sind infolgedessen zu gleicher Zeit Säuren und Basen. Derartige Elektrolyte nennt man amphoter. Die sauren und basischen Gruppen halten sich ungefähr die Waage, deshalb reagieren die meisten Monoaminocarbonsäuren in wässriger Lösung praktisch neutral, sie lassen sich weder mit Säuren noch mit Alkalien wie andere Basen oder Säuren titrieren. Dies gelingt jedoch, wenn man den Einfluß einer der beiden Gruppen im Molekül ausschaltet, in diesem Falle kommt die andere dann voll zur Wirkung und läßt sich anstandslos titrieren.

Bei der Formoltitration macht man von der Tatsache Gebrauch, daß Formaldehyd mit der Aminogruppe der Aminosäuren folgendermaßen reagiert:

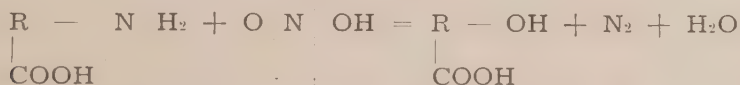


Nach Art der Schiff'schen Reaktion entsteht aus der basischen NH_2 -Gruppe die neutrale $\text{N}=\text{CH}_2$ -Gruppe; damit ist der amphotere Charakter der Aminosäure aufgehoben, die COOH -Gruppe kommt als solche voll zur Geltung und läßt sich wie jede organische Säure mit Alkali gegen Phenolphthalein titrieren. Durch die Formoltitration werden also in Wirklichkeit die Carboxylgruppen erfaßt, da aber

jeder titrierten Carboxylgruppe eine Aminogruppe äquivalent ist, stellt die Formoltitration auch ein Maß für den Aminostickstoff dar. Die Formoltitration wurde von S. P. L. Sørensen entwickelt und von H. Lüers in die heute im Brauereilaboratorium übliche Form gebracht.

Der basische Charakter der Aminogruppe verschwindet auch, wenn man die wässrige Aminosäurelösung mit einem Überschuß von Alkohol versetzt. Die Aminosäure läßt sich dann nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz wie eine einfache Säure mit Alkali titrieren.

Alle aliphatischen Aminogruppen reagieren mit salpetriger Säure unter in Freiheitsetzung von elementarem Stickstoff und Bildung einer Oxygruppe. Davon macht die gasvolumetrische Bestimmung des Aminostickstoffs von van Slyke Gebrauch, die übrigens auch als Mikromethode ausgearbeitet ist. Die Reaktion verläuft folgendermaßen:

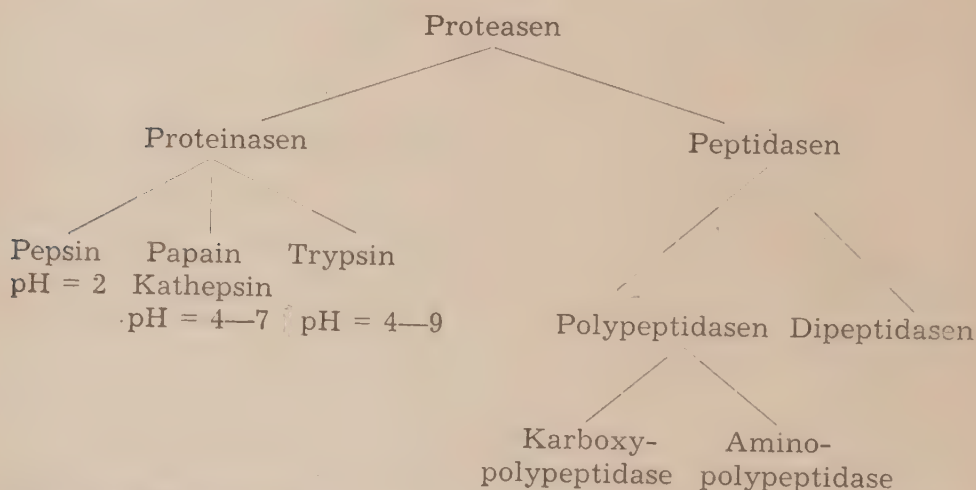


Es entsteht also die doppelte Menge des in der Aminosäure enthaltenen Stickstoffs. Während die Formoltitration in Wirklichkeit die Carboxylgruppen erfaßt, zielt die Methode von van Slyke unmittelbar auf die Aminogruppen ab. Wendet man beide Methoden gleichzeitig auf ein Proteinhydrolysat an, so gewinnt man darüber Aufschluß, in welchem Verhältnis Amino- und Carboxylgruppen in Freiheit gesetzt werden, was für die Ermittlung der Bindungsverhältnisse der Aminosäuren in den Proteinen von Bedeutung ist (siehe später).

2. Hydrolyse der Proteine durch Enzyme.

Außer durch Säuren und Alkalien, also durch H- und OH-Jonen, lassen sich die Proteine, wie alle anderen dem Stoffwechsel dienenden zusammengesetzten Naturstoffe durch Enzyme aufspalten. Die Enzyme sind als die von den Zellen selbst gebildeten biochemischen Katalysatoren zu betrachten, deren Funktion sowohl der Abbau der Proteine zu den Aminosäuren als auch deren Aufbau aus letzteren ist. Die Enzyme des Eiweißstoffwechsels gehören zur großen Gruppe der Hydrolasen d. h. derjenigen Enzyme, welche durch Anlagerung der Elemente des Wassers also von H- und OH-Jonen eine Hydrolyse höher molekularer Stoffe zu einfacheren Spaltprodukten be-

wirken. Die speziell auf die Proteine wirkenden Enzyme heißen Proteasen und umfassen eine große Anzahl von Individuen, in welche erst in neuester Zeit einigermaßen Ordnung gebracht werden konnte. Infolge ihrer Substratspezifität lassen sich die Proteasen in zwei Hauptgruppen, die Peptidasen und die Proteinasen einteilen. Die Arbeiten von Willstätter, Graßmann, Waldschmidt-Leitz und ihren Mitarbeitern haben die Spezifität der einzelnen Enzymtypen aufgezeigt und zugleich weitere Einblicke in den konstitutiven Aufbau der Proteine vermittelt. Es mag hier nur so viel gebracht sein, als zum allgemeinen Verständnis nötig erscheint, und dies in möglichst vereinfachter, schematisierter Form. Nach Graßmann läßt sich folgende speziellere Einteilung der Proteasen vornehmen:

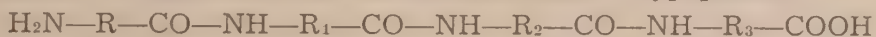


Wenn im folgenden die einzelnen Enzymtypen etwas näher charakterisiert werden, so läßt es sich nicht vermeiden, daß einige Begriffe vorweg genommen werden, welche erst in den nächsten Kapiteln ihre Erörterung finden. Das möge der Leser berücksichtigen.

Pepsin ist auf die Spaltung von Eiweißkationen, Trypsin auf die von Eiweißanionen und Papein (Kathepsin) auf die von isoelektrischem Eiweiß eingestellt. Papain und Kathepsin werden durch Blausäure, Schwefelwasserstoff und durch SH-Verbindungen, z. B. Glutathion aktiviert. Das Trypsin besitzt einen in seiner Konstitution noch unbekannten Aktivator, die Enterokinase, während beim Pepsin ein Aktivator unbekannt ist.

Bei den Peptidasen findet man eine mit dem Bau der Substrate zusammenhängende Spezifität. Es gibt Enzyme unter ihnen, welche nur Dipeptide hydrolysieren, deshalb Dipeptidasen genannt werden,

und solche, welche höhere Peptide, die aus drei und mehr Aminosäuremolekülen aufgebaut sind, zu spalten vermögen. Unter diesen Polypeptidasen genannten Enzymen unterscheidet man wiederum zwei Untergruppen, die Karboxy- und die Aminopolypeptidasen. Vergewenwärtigen wir uns das Schema eines Polypeptides



so benötigen die Aminopolypeptidasen zu ihrem Angriff eine freie Aminogruppe (links) im Polypeptidmolekül, während die Karboxypolypeptidasen an einer freien Karboxylgruppe (rechts) angreifen. Auf weitere, feinere Struktur- und Stereospezifitäten dieser Enzyme kann hier nicht eingegangen werden.

Aus der großen Gruppe der Proteasen seien folgende Enzyme etwas näher betrachtet, weil sie, seit langem bekannt, für den Eiweißstoffwechsel besondere Bedeutung haben oder technisch angewandt werden.

Das Pepsin.

Nach biochemischen Untersuchungen von Linderström-Lang und Holter wird das Pepsin von den Drüsenzellen der Fundusschleimhaut des Magens in einer unwirksamen Vorstufe als Pepsinogen sezerniert und von der Salzsäure des Magens in das aktive Enzym übergeführt. Northrop ist es gelungen, das Pepsin in kristallisierter Form zu erhalten, er sprach es, da sich beim Umkristallisieren die Aktivität nicht änderte, als reines Enzym an. Das Pepsin wirkt optimal bei stark saurer Reaktion (pH 1,8—2) auf Eiweißkationen ein. Es spaltet genuine Proteine (nicht Protamine), die entweder Tyrosin oder Phenylalanin und mindestens eine freie Karboxylgruppe enthalten müssen. Im allgemeinen geht der Abbau nicht sehr tief und macht bei Polypeptiden Halt. Das Pepsin hat auch, wenngleich schwächer ausgeprägt, eine labende Wirkung auf das Kaseinogen der Milch.

Das Chymosin oder Labenzym kommt im Labmagen säugender Tiere (Kälber, Schweine, Schafe) vor. Es bringt die Milch dadurch zur Gerinnung, daß das Kaseinogen in einen ihm nahestehenden Eiweißkörper, das Parakasein, übergeführt wird, das dann zusammen mit Kalziumsalzen aufflockt. Es wirken hier anscheinend zwei Vorgänge ein enzymatischer und ein kolloidchemischer zusammen. Optimales pH = ca. 6,0. Lüers und Diem, ferner Lüers und Bader haben das Chymosin einer Reinigung und Konzentrierung unterzogen. Während gute Handelspräparate eine Labstärke von 1 : 20 000 bis 1 : 100 000 besitzen, wies das reinste Präparat eine solche von

1 : 16,5 Millionen auf. Ebenso wie die meisten Pepsinasen Labwirkung besitzen, zeigt das Chymosin auch Pepsinwirkung.

In der Milchwirtschaft wird das Labenzym in großem Maßstab zur Gewinnung des Käsestoffes oder Bruches (Labkäserei) verwendet.

Das Trypsin.

Dieses für die Proteolyse im Darm wichtige Enzym wird von der Pankreasdrüse zunächst in unwirksamer Form als Trypsinogen abgesondert und durch Zusammentreffen mit der vom Dünndarm sezernierten Enterokinase auf enzymatischem Wege unter Ablösung eines Hemmungstoffes ins aktive Trypsin übergeführt. Das Trypsin seinerseits vermag ebenfalls Trypsinogen in Trypsin überzuführen. Die Verhältnisse der Aktivierung und Hemmung sind bei diesem Enzym ziemlich verwickelt gelagert. Das optimale pH liegt etwa bei 8, entsprechend der Reaktion im Darmsaft.

In den Pflanzen, z. B. im Milchsaft des Feigen- und des Melonenbaumes (*Carica papaya*), ebenso auch in der Hefe, findet sich eine bei pH 4—5 optimal wirkende Proteinase, seit langem unter der Bezeichnung *Papain* bekannt. Das Enzym ist ein Protein mit Redoxeigenschaften, die auf freie SH-Gruppen im Molekül zurückzuführen sind. Papain wird, wie schon erwähnt, von Blausäure, Schwefelwasserstoff, Glutathion aktiviert, durch Oxydationsmittel und Schwermetalle gehemmt. Auch das Kathepsin, die bei pH 4—5 optimal wirkende Gewebeproteinase des tierischen Organismus stellt einen dem Papain verwandten Enzymtyp dar.

Im keimenden Getreide (Malz) fanden Lüers und Malsch gleichzeitig mit Mill und Linderström-Lang eine Proteinase vom Papaintyp mit einem pH—Optimum von 4,9—5,0 bei Gelatine als Substrat. Ihre Wirksamkeit wird durch HCN um 50% gesteigert. Außerdem ist noch eine Dipeptidase vorhanden, die optimal bei pH 7,5 auf Leuzyl-glyzin wirkt. Zwischen Umsatz und Enzymmenge, ebenso zwischen Umsatz und Zeit herrscht direkte Proportionalität. Durch Aluminiumhydroxyd A läßt sich eine Trennung beider Enzyme bewerkstelligen. Schließlich fanden Lüers und Löther im Malzauszug noch ein Enzym, welches die Strukturviskosität der Gelatine sehr rasch, z. B. unter den gewählten Versuchsbedingungen in 15 Minuten bei pH = 5 um 50% erniedrigt, während in der gleichen Zeit der Zuwachs an Aminogruppen nur 3,2% des in 23 Stunden erreichten Endabbaues beträgt. Es liegt also ein ähnlicher Fall wie bei der Stärkeverflüssigung vor, nämlich eine durch Lösung

von Nebenvalenzen sich physikalisch chemisch stark auswirkende Depolymerisation.

Wie bereits einleitend zu diesem Abschnitt erwähnt wurde, haben sich Studien über den enzymatischen Abbau von Proteinen auch für die Vorstellungen über die Konstitution der Proteine als sehr fruchtbar erwiesen. Die Grundlagen der Methodik stammen von Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Graßmann und deren Mitarbeitern. Darauf fußend untersuchte später Calvery den enzymatischen Abbau von weitgehend gereinigtem und genau definiertem Eialbumin mit Hilfe weitgehend gereinigter proteolytischer Enzyme verschiedener Art. Das Ergebnis seiner Versuche soll als ein typisches Beispiel für viele andere hier gebracht werden.

Pascual Jordan, der die Versuche Calvery's als Stütze für seine Peptoltheorie des Eiweißaufbaues auswertete, rechnete die Versuchsergebnisse folgendermaßen um. Calvery hat bei der Berechnung der Anzahl der jeweils von den einzelnen Enzymen oder Enzymkombinationen gespaltenen Peptidbindungen für die Gesamtzahl N der Aminosäurereste in Molekül 270 gesetzt. Da heute aber mit der Zahl 288 zu rechnen ist (siehe C_2 und D_3), sind die von Calvery angegebenen Anzahlen hydrolysierter Peptidbindungen um 7% zu erhöhen. Die folgende Tabelle enthält die auf diese Weise korrigierten Versuchsergebnisse von Calvery.

Enzymatische Hydrolyse von Eialbumin.

	exp.	theor.
Pepsin	96	96
Trypsin	96	96
Papain—HCN	192	192

Nach Pepsin:

Trypsin	0	0
Protaminase	22	24
Aminopolypeptidase	96	96
Protaminase darn. Aminopolypept. (oder Protaminase + Carboxypolypept.)	96	96
Papain — HCN	96	96

Nach Trypsin:

Pepsin	0	0
Protaminase	27	24
Aminopolypeptidase	134	144
Protaminase, dann Aminopolypeptid. (oder Protaminase + Carboxypolypept.)	134	144
Papain — HCN	77	72

Nach Papain—HCN

Pepsin oder Trypsin	0	0
Protaminase	0	0
Aminopolypeptidase	37	36
Carboxypolypeptidase	37	36

Daraus ist zu entnehmen, daß nur die Enzyme Pepsin, Trypsin und Papain den Angriff auf das Molekül eröffnen können, die anderen Enzyme dagegen nicht. Hat sich eines der drei erstgenannten Enzyme ausgewirkt, so gibt z.B. die Anwendung von Erepsin stets vollständige Hydrolyse. Wie erwähnt, gelang es durch systematische Anwendung eines aufeinanderfolgenden Enzymangriffs auf das Protamin Clupein zu einer weitgehenden Aufklärung seines Aufbaues zu gelangen.

Pascual Jordan, sieht wie erwähnt, in den Befunden der enzymatischen Hydrolyse eine Bestätigung seiner Theorie über den Aufbau der Sphäropoteine aus Tripeptolringen. Die den Angriff eröffnenden Enzyme z.B. Pepsin, Trypsin wirken nach seiner Ansicht nur auf Dreier ringe und zwar im Sinne einer Aufspaltung

zu Tripetiden. Die übrigen Enzyme außer Trypsin, Pepsin und Papain, also Erepsin, Amino-Carboxypolypeptidase, Protaminase wirken dagegen nur auf Tripeptide und Dipeptide, nicht aber auf Ringe ein. Sind die Ringe von den erstgenannten, den Angriff eröffnenden Enzymen gesprengt, so baut z. B. das Erepsin bis zu den letzten Aminosäuren ab.

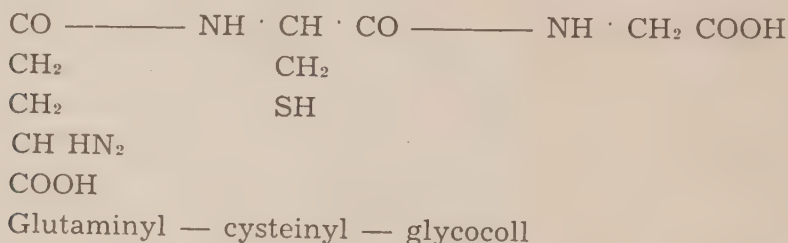
Werden durch Hitzedenaturierung (s. d.) nach P. Jordan die Tripeptolringe in gestreckte Peptidketten übergeführt, so vermögen die letztgenannten Enzyme das Molekül anzugreifen, während sie das genuine Molekül nicht abzubauen vermögen.

Produkte der partiellen Hydrolyse der Proteine. Sowohl mit Säuren und Alkalien bei vorsichtigem und schonendem Arbeiten (sehr verdünnte Säure, niedrigere Temperaturen) ganz besonders aber durch eine stufenweise enzymatische Hydrolyse der Proteine gelingt es, den Abbau derselben nicht bis zu den Endprodukten, den Aminosäuren zu treiben, sondern ihn bei Erreichung von Zwischenprodukten zu unterbrechen. Die Verhältnisse sind vergleichbar mit dem Abbau der Stärke (Amylose) der mit Säuren bis zur Glukose geht, bei vorsichtigem Arbeiten oder aber besonders bei der gesteuerten Einwirkung von Diastase bis zur Maltose oder daneben zu mit Jod sich rot bis violett färbenden Dextrinen geleitet werden kann. Bei der partiellen Hydrolyse der Proteine entstehen als erste Abbauprodukte hochmolekulare Verbindungen, welche in ihren Eigenschaften den Proteinen in vielem noch nahe stehen, sich aber vor allem dadurch von diesen unterscheiden, daß sie nicht mehr durch Hitze zum Koagulieren gebracht werden können. Man bezeichnet diese ersten Proteinabbauprodukte als **Proteosen** und spricht, wenn sie sich von Albuminen ableiten von „Albumosen“, wenn sie von Globulinen herkommen von „Globulosen“. Die Proteosen lassen sich bei saurer Reaktion mit Ammonsulfat, besonders mit Zinksulfat aussalzen, geben noch die Fällungs- und Färbungsreaktionen der Proteine, z. B. reagieren sie auch noch mit Tannin und anderen Gerbstoffen. Die Biuretreaktion ist rotviolett. Sie zeigen kein oder nur ein sehr geringes Diffusionsvermögen und besitzen noch ein hohes Molekulargewicht. In chemischer Beziehung sind sie keine einheitlichen Körper sondern Gemische verschiedener Abbauprodukte.

Eine weitere, nächst niedere d. h. niedriger molekulare Abbaustufe der Proteine stellen die **Peptone** dar, welche besonders bei der Einwirkung von Pepsin-Salzsäure auf Proteine entstehen. Sie werden nicht mehr durch Salze gefällt, finden sich infolge-

dessen im Filtrat der Zinksulfatfällung, welche letztere die Proteosen enthält. Sie zeigen bereits Diffusionsvermögen und geben nur noch zum Teil gewisse Fällungsreaktionen der Proteine z. B. mit Tannin, Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure, wobei die Niederschläge im Überschuß des Fällungsmittels meist löslich sind. In 96%igem Alkohol sind sie teilweise löslich. Die Biuretreaktion ist rein rot. Vom konstitutionschemischen Standpunkt aus können die Peptone als Gemische verschieden hochmolekularer Polypeptide betrachtet werden.

Bei weit fortgeschrittener Hydrolyse lassen sich unter den Spaltprodukten der Proteine auch einfache Peptide, aus zwei, drei oder vier Aminosäuren aufgebaut isolieren. In verschiedenen Fällen konnten derartige Di- und Tripeptide in ihrem chemischen Aufbau genau aufgeklärt werden. Als Beispiel diene die Konstitution des Glutathions, das zwar kein Spaltprodukt der Proteine, aber ein für den Zellstoffwechsel wichtiges Tripeptid folgender Zusammensetzung ist:

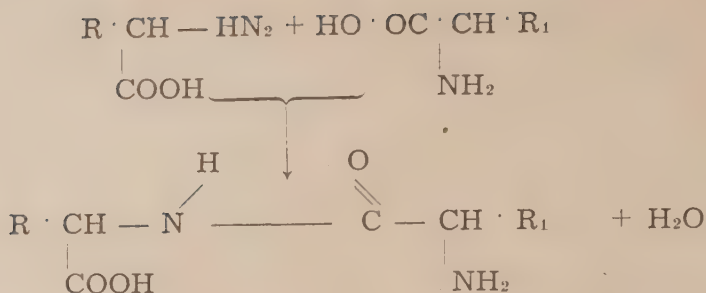


C. Konstitution der Proteine

Seit den Zeiten Emil Fischers hat die organische Chemie nie aufgehört, mit Hilfe der im Laufe der Jahrzehnte sich dauernd fortentwickelnden Arbeitsmethoden der Konstitution der Eiweißkörper auf den Grund zu kommen, ohne dieses Ziel bis heute restlos zu erreichen. Der große Aufwand an Arbeitskraft und Scharfsinn hat im Wesentlichen die bereits von E. Fischer meisterhaft konzipierte und experimentell unterbaute Vorstellung vom Bauplan der Proteine bestätigt. Eine starke Förderung erfuhren die Anstrengungen zur Konstitutionsermittlung der Proteine von Seiten der Enzymchemie, gelang es doch auf dem Wege systematischer durch Enzyme in die Wege geleiteter Abbauversuche sich ein recht vollkommenes Bild von der Struktur relativ einfach gebauter Proteine, wie des Clupeins zu machen. Schließlich erwiesen sich auch die an den hochmolekularen, polymeren Natur- und Kunststoffen entwickelten physikalischen, physikochemischen und kolloidchemischen Arbeitsmethoden als sehr fruchtbar, das auf andere Weise gewonnene Bild von der Struktur der Proteine zu ergänzen und abzurunden.

1. Die Verknüpfung der Aminosäuren; die Peptidbindung.

Es ist im Wesentlichen das unvergängliche Verdienst Emil Fischers, nicht nur gezeigt zu haben, daß die im vorigen Kapitel erwähnten Aminosäuren die letzten Bausteine der Proteinmoleküle sind, sondern er konnte auch darüber hinaus durch synthetische Versuche dafür den Beweis bringen, daß die einzelnen Aminosäuren im Proteinmolekül säureamidartig miteinander verknüpft sind und zwar in der Weise, daß eine Aminogruppe einer Aminosäure mit einer Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure unter Wasseraustritt zusammentritt, wie es folgendes Schema zeigt:



Die Bindung — CO · NH — wurde von E. Fischer in Anlehnung an die Bezeichnung Saccharid Peptidbindung genannt, was sich bis heute erhalten hat.

Durch Zusammentreten zweier Aminosäuren entstehen Dipeptide, tritt mit einem Dipeptid in der gleichen Weise eine dritte Aminosäure zusammen, so entsteht ein Tripeptid und so fort bis zu den aus einer großen Zahl von Aminosäuren aufgebauten Polypeptiden. E. Fischer synthetisierte in mühevollen Versuchen ein aus 18 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, das sich in seinen Eigenschaften als weitgehend übereinstimmend mit den als Peptone bezeichneten Abbauprodukten der Proteine erwies. Außerdem wurde es von Enzymen ebenso wie Peptone in einfachere Peptide gespalten. Die Tatsache, daß E. Fischer und später E. Abderhalden eine große Anzahl von Di- Tri- und Tetrapeptiden synthetisierten, die zum Teil sich als identisch mit Peptiden erwiesen, welche durch Säurehydrolyse oder Enzymeinwirkung aus Proteinen ebenfalls erhalten wurden und ferner, daß diese synthetischen Peptide sich enzymatisch aufspalten ließen, war für E. Fischer ein, auch heute nicht zu erschütternder Beweis, daß die Verknüpfung der Aminosäuren im Eiweißmolekül in der Tat auf dem Wege der Peptidbildung erfolgt.

Die neueren Arbeiten von Waldschmidt-Leitz, sowie Graßmann über den enzymatischen Abbau der Proteine erbrachten den Beweis, daß der bei der Proteolyse stattfindende Zuwachs an Aminogruppen ebenso groß ist wie der Zuwachs an Carboxylgruppen, was zusammen mit anderen Befunden an der enzymatischen Proteinhydrolyse nur mit der Lösung von Peptidbindungen zwanglos erklärt werden kann.

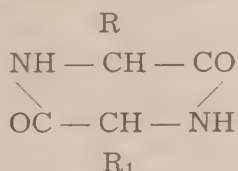
Bei der Säurehydrolyse der Proteine entsteht immer eine mehr oder weniger große Menge Ammoniak. Da dessen Menge der erhaltenen Menge an Aminodicarbonsäuren, — Asparagin- und Glutaminsäure, — proportional ist, muß angenommen werden, daß Ammoniak ein regelrechter Baustein des Proteinmoleküles ist und in

Säureamidform als Asparagin und Glutamin auftritt. Die β — ständige Carboxylgruppe der beiden Dicarbonsäuren nimmt an der peptidartigen Verknüpfung der Aminosäuren also nicht Anteil. Das Gleiche ist der Fall für die ϵ -Aminogruppe des Lysins, sowie den Guanidylrest des Arginins, welche frei aus dem Eiweißmolekül herausragen, was sich durch Behandlung der Proteine mit salpetriger Säure oder Oxydation mit Salpetersäure und Analyse der darauf hin erhaltenen Hydrolysenprodukte nachweisen läßt. Ebenso wenig nimmt die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins, die β -Hydroxylgruppe des Serins und der Imidoazolring des Histidins an internen Bindungen des Proteinmoleküls teil. Die freien Amino- und Oxygruppen können unter Umständen die Anknüpfungspunkte für andere Gruppen von nicht Proteinnatur z. B. prosthetische Gruppen bilden.

In nachfolgender Figur ist rein schematisch der Aufbau einer Polypeptidkette veranschaulicht. Am unteren Ende tritt eine freie Aminogruppe, am oberen Ende eine freie Carboxylgruppe in Erscheinung. Nach rechts ragen aus der Peptikette die Reste der einzelnen am Aufbau beteiligten Aminosäuren heraus z. B. das Lysin mit einer endständigen NH_2 -Gruppe, die Glutaminsäure mit ihrer endständigen COOH -Gruppe, das Tyrosin mit einer OH-Gruppe, das Histidin mit dem Imidoazolring, das Leucin mit den beiden CH_3 -Gruppen, um nur einige Beispiele zu bringen.

Trotzdem die Peptidtheorie E. Fischer's als fest fundiert galt und auch heute noch gilt, hat es im Laufe der Zeit nicht an Versuchen gefehlt, auch andere Bindungsarten des Stickstoffs im Proteinmolekül zu diskutieren. Trönsegaard z. B. setzt sich für das Vorliegen heterocyklischer Ringe (Pyrrol-, Pyrrolidin-Glyoxalinverbindungen ein).

Viel diskutiert ist die Möglichkeit des Vorkommens von Dioxo-(Diketo-) piperazinbindungen im Proteinmolekül. Eine derartige Struktur sieht wie folgt aus:



Und zwar schloß man auf derartige Verknüpfungen, weil sie sich unter den Spaltprodukten der Proteine finden und außerdem bei der Reduktion (Abderhalden) und bei der Oxydation mit HOBr (St. Goldschmidt) der Proteine erhalten werden können. Karrer und M.

COOH ← — Carboxylgruppe

H C — R

H N

O C

H C — CH₂ — CH $\begin{matrix} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{matrix}$

Leucin

Peptid
bindung →

H N

O C

H C — CH₂ — $\begin{matrix} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{matrix}$ OH Tyrosin

do →

H N

O C

H C — CH₂ — CH₂ — COOH Glutaminsäure

do →

H N

O C

$\begin{matrix} & \diagup \text{CH} \diagdown \\ & \text{N} \quad \text{NH} \\ & | \quad | \\ \text{H C} - \text{CH}_2 - & \text{C} = \text{C} \end{matrix}$

Histidin

do →

H N

O C

H C — CH₂ — CH₂ — CH₂ — CH₂ NH₂ Lysin

do →

H N

O C

H C — NH₂ Alanin

CH₃ ▲

Aminogruppe

Bergmann erörtern die Möglichkeit des Vorkommens noch andersartiger Bindungen z. B. von Oxazol- und Oxazolinringen, um damit die ungemeine Aktivität und Wandelbarkeit der Proteine erklären zu können, welche auf Grund der Polypeptidketten oder Diketopiperazinringe nicht erklärlich seien.

Was jedoch gegen diese Vorschläge eingewendet werden kann und auch immer eingewendet worden ist, ist der Umstand, daß bisher eine enzymatische Spaltbarkeit solcher Verbindungen nicht nachgewiesen werden konnte. Damit bleibt die Peptidbindung als das hervorragende Bauprinzip der Proteine bestehen, wenn gleich es nicht ausgeschlossen erscheint, daß daneben in untergeordnetem Maße auch noch andersartige Bindungen vorkommen können.

2. Gesetzmäßigkeiten in der Anordnung der Aminosäuren.

Die Analyse der durch hydrolytischen Abbau erhaltenen Bausteine hat ergeben, daß am Aufbau der Proteine etwa 25—30 verschiedene Aminosäuren beteiligt sind. Wie die Bestimmung der Molekulargröße der Proteine (s. u.) zeigt, weisen die Proteine im allgemeinen ein Molekulargewicht von 34 000 oder ein Vielfaches davon auf. Somit enthält ein derartiges Molekül rund 300 Aminosäuren. Die 25 bis 30 verschiedenen Aminosäuren erlauben nun die verschiedensten Kombinationsmöglichkeiten, womit sich eine ungeheure Variabilität und zugleich Spezifität im Aufbau der Proteine ergibt. Man darf jedoch annehmen, daß die Natur nicht wahllos von den gegebenen Kombinationsmöglichkeiten Gebrauch macht, sondern die Proteine nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten aufbaut, die aufzufinden das Ziel chemischer Strukturforschung ist.

Am erfolgreichsten erwiesen sich derartige Versuche an den einfachsten Proteinen, nämlich den Protaminen, wie sie beispielsweise in den Spermatozoen der Fische vorkommen. Durch systematisch gelenkten, stufenweisen Abbau des Clupeins aus Heringsmilch mit Hilfe ausgewählter und definierter Enzyme und Analyse der jeweils erhaltenen Spaltstücke konnten Waldschmidt-Leitz und Felix einen Bauplan dieses Proteins entwerfen. Als Bausteine wurden gefunden: Arginin (A), Alanin (AL), Serin (S), Prolin (P), Oxyprolin (OP) und Valin (V). Dem Clupein kommt folgendes Bauschema zu:

HN = P — AA — AA — V — S — AA — AA — OP — V — AA —
 AA — P — AL — AA — AA — P — S — AA — AA — V — AL —
 AA — COOH.

Man erkennt daraus, daß immer auf Paare von Arginyl-Argininresten Monoaminosäuren folgen, sodaß eine gesetzmäßige Periodizität in der Peptidkette zu beobachten ist.

Auf Grund theoretischer Überlegungen kamen M. Bergmann und Mitarbeiter auch an komplizierter zusammengesetzten Proteinen zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich daß in jedem Eiweißkörper jeder einzelne Aminosäurebaustein in konstanten Intervallen über die ganze Peptidkette verteilt ist oder anders ausgedrückt, daß jeder Aminosäurerest in einer charakteristischen ganzen Nummernfrequenz wiederkehrt. So besteht z. B. beim Rinderbluthaemoglobin $\frac{1}{16}$ aller Aminosäurereste aus Lysin, $\frac{1}{18}$ aus Histidin, $\frac{1}{26}$ aus Glutaminsäure, $\frac{1}{48}$ aus Tyrosin, $\frac{1}{192}$ aus Cystin, um einige nur zu nennen. Aus vielen an verschiedenen Proteinen durchgeführten Berechnungsergebnissen kommt Bergmann zum Schluß, daß die Proteine aus 288 Aminosäureresten oder einem Vielfachen davon bestehen. Die Gesamtzahl der einzelnen Aminosäuren im Proteinmolekül, und die Anzahl der einzelnen Aminosäuren läßt sich durch

$$N = 2^n \times 3^m$$

ausdrücken, wobei n und m sowohl 0 als andere Zahlenwerte annehmen können.

Ohne hier auf weitere Einzelheiten einzugehen, beweisen diese Überlegungen, daß sich bereits ein gewisses Bild vom Bauplan der Proteine abzuzeichnen beginnt, daß auf allgemein gültige Gesetzmäßigkeiten hindeutet.

D. Proteine als hochmolekulare Stoffe

Mit verschiedenen anderen hochmolekularen Naturstoffen wie Cellulose, Stärke, Pektinen, Kautschuk haben die Proteine die Eigenschaft gemeinsam, in Lösung kolloide Systeme zu bilden, für deren Studium die bewährten rein chemischen Methoden der organischen Chemie versagen. Bei der Bedeutung der synthetisch gewonnenen hochmolekularen Stoffe wie Polyvinyl-, Polystyrolverbindungen, Aminoplasten, Bakeliten u. a. m. für die Technik wurden in den letzten 15 bis 20 Jahren in zunehmenden Maße Methoden besonderer Art entwickelt, welche sich zum Studium der Hochmolekularen, darunter auch der Proteine als wertvoll erwiesen. Im folgenden werden vor allem die Verhältnisse kurz berührt, welche sich aus der Molekülgröße und dem elektrochemischen Verhalten der Proteine ergeben.

1. Bindungskräfte im Proteinmolekül.

Bei Stoffen mit kleinerem Molekulargewicht findet die Absättigung der Atome und Molekülgruppen durch Hauptvalenzkräfte statt. Trotzdem vermag das Molekül nach außen noch durch Anziehungskräfte zu wirken, die man van der Waal'sche Kräfte nennt und die bei Siedepunkt, Schmelzpunkt, Gitterkräften im Kristall, bei Adsorptionsvorgängen und beim Entstehen von Molekülverbindungen in Erscheinung treten. Die Stärke der zwischen den Molekülen wirkenden Anziehungskräfte wächst mit steigendem Molekulargewicht, sodaß sie auf das Verhalten von hochmolekularen Stoffen wie den Proteinen noch weit mehr Einfluß ausüben als auf das der einfacheren, niedriger molekularen Stoffe.

Weiter kommt für das Bestreben hochmolekularer Stoffe sich zu größeren Aggregaten zusammenzulagern, zu assoziieren, und für ihr Verhalten gegen Lösungsmittel die Art und Menge der polaren und apolaren Gruppen im Molekül in Frage. Polare Gruppen sind solche,

welche elektrolytisch dissoziieren, starke Dipole darstellen, oder stark polarisierbar sind z. B. die Gruppen COOH , OH , NH_2 , NH , diese lagern Wasser an, man nennt sie deshalb hydrophile Gruppen. Apolare Gruppen dagegen sind z. B. CH_3 , CH_2 , CCL , C_6H_5 , sie lagern z. B. Benzol oder andere Fettlösungsmittel wie Chloroform, Tetrachloraethan an und werden lipophile Gruppen genannt. Alkohol enthält gleichzeitig die polare OH - und die apolare C_2H_5 -Gruppe. Proteine enthalten die ionisierbaren — COOH und — NH_2 -Gruppen, die polarisierbaren = NH , — OH und = O Reste, das sind alles polare hydratisierbare Gruppen, während z. B. die Phenyl- und Indolgruppen, ebenso die Methylgruppen ausgesprochen apolar und lipophil sind. Von dem gegenseitigen Mengenverhältnis beider wird es abhängen, ob ein Protein wasserlöslich, oder wie bei Gliadin, Zein, Hordein alkohollöslich ist. Die letzteren drei Prolamine enthalten viele apolare Gruppen, daneben aber auch polare Gruppen, sodaß sich 70%iger Alkohol als geeignetes Lösungsmittel, während sowohl Wasser wie absoluter Alkohol sich als ungeeignete Lösungsmittel erweisen. Auch die Anlagerung von Lipoiden an Proteine ist auf die „solvatisierende“ Betätigung apolarer Gruppen im Proteinmolekül zurückzuführen.

Eine Frage, die sehr viel discutiert wurde ist die, ob die Eiweißmoleküle wirklich sehr große Moleküle darstellen, die durch Hauptvalenzkräfte aus den Atomen und Atomgruppierungen sich aufbauen, oder ob sie aus kleineren Basteien oder Individualgruppen durch Nebenvalenzkräfte zusammengehalten werden.

Die von Staudinger an hochmolekularen synthetischen Stoffen systematisch durchgeführten Untersuchungen, sowie die Befunde an Röntgendiagrammen hochmolekularer Naturstoffe durch Meyer und Mark haben heute der Auffassung den Vorrang gegeben, daß die Proteine lange, durch Hauptvalenzkräfte aufgebaute Peptidketten darstellen, deren Verknüpfung in Richtung einer Dimension erfolgt, sodaß fadenförmige Moleküle im allgemeinen zustande kommen. Zwischen den Fadenmolekülen können allerdings auf dem Wege von Querverbindungen z. B. mit Hilfe der SH -Gruppe, die in die — S — S — Gruppe übergeht, Vernetzungen eintreten, die dann zu zwei- oder dreidimensionalen Gebilden führen. Durch derartige Vernetzungen kann die Löslichkeit stark herabgesetzt werden, was z. B. auch bei der Hitze-koagulation der Proteine der Fall sein kann.

Während über die Tatsache, daß die Proteine aus langen Peptidketten aufgebaut werden, einheitliche Auffassung herrscht, bestehen noch Meinungsverschiedenheiten darüber, ob das kleinste kolloide

Teilchen, das den Namen Albumin oder Globulin verdient, eine Mizelle aus einem Bündel durch Nebenvaleanzkräfte zusammengehaltener Fadenmoleküle darstellt (Meyer u. Mark) oder ob es ein Riesenmolekül (Makromolekül) mit den für solche Moleküle charakteristischen kolloiden Eigenschaften ist. (Staudinger). Die neueren Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung (s. u.) der Proteine, sowie noch andere physikalisch-chemische Methoden wie Diffusionsmessungen und Bestimmung des osmotischen Druckes haben gezeigt, daß viele Proteine tatsächlich Makromoleküle als Grundeinheiten enthalten, daß aber gleichzeitig viele solcher Makromoleküle sich zu höheren Einheiten zusammenlagern können, wenn die äußeren Bedingungen dazu günstig sind und bei Änderung dieser Bedingungen in die Grundeinheiten zerfallen, sodaß, wie Sørensen sich ausdrückt, die Proteine als reversibel dissoziabile Komponentensysteme betrachtet werden können.

2. Physikalische Chemie: Molekulargewicht (Teilchengröße und Gestalt)

Die in der organischen Chemie üblichen Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung, nämlich auf kryoskopischem (Gefrierpunktniedrigung) oder ebullioskopischem (Siedepunktserhöhung) Wege, versagen bei Verbindungen, deren Molekulargewicht in der Gegend von 10 000 und mehr liegt. Dagegen gelingt dies, wie insbesondere S. P. L. Sørensen in vorbildlich gewordenen exakten Untersuchungen zeigte, auf dem Wege der Messung des osmotischen Druckes von Proteinlösungen, wobei allerdings einige Kunstgriffe anzuwenden sind, die hauptsächlich darin bestehen, daß man die durch freie Carboxyl- und NH_2 -Gruppen bedingte Elektrolytnatur der Proteine, welche die Erscheinungen kompliziert, durch Zusatz einer gewissen Salzkonzentration innerhalb und außerhalb der Osmometermembran kompensiert und die dabei auftretenden Donnan-Membrangleichgewichte bei den Berechnungen berücksichtigt. Nach derartig durchgeführten Messungen von Sørensen, Adair, Loeb, Buck und Greenberg ergaben sich z. B. folgende Molekulargewichte für einzelne Proteine.

Ovalbumin 34 000; Serumglobulin 80-140 000; Serumalbumin 62 000; Gelatine 68 000; Oxyhaemoglobin 65—68 000; Euglobulin 174 000. Sørensen machte weiterhin die bemerkenswerte Beobachtung, daß sich manche Proteine durch schonende Behandlung mit physikalischen Hilfsmitteln in Fraktionen niedrigeren Molekulargewichtes mit von einander verschiedenen physikalischen und chemischen

Eigenschaften aufteilen lassen. Wurden die Fraktionen wieder vereinigt, so stimmte die Mischung in ihren Eigenschaften wieder mit dem ursprünglichen Protein überein. Daraus zog Sörensen den Schluß, daß die Proteine reversibel dissoziablen Komponentensysteme darstellen, eine Schlußfolgerung, die durch andere chemische Methoden (Ultrazentrifuge) sowie ihr Verhalten im Stoffwechsel des Organismus eine Stütze findet.

Einen größeren Fortschritt auf dem Wege zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Proteine stellen die von dem schwedischen Physiker The Svedberg und seinen Mitarbeitern ausgeführten Untersuchungen mit Hilfe der Ultrazentrifuge dar. Nach dieser Methode erfolgt die Molekulargewichtsbestimmung entweder aus dem Sedimentationsgleichgewicht oder der Sedimentationsgeschwindigkeit. Das Sedimentationsgleichgewicht stellt sich derart ein, daß die Konzentration d. h. die Teilchenzahl oder die Dichte der Lösung in gesetzmäßiger Weise von unten nach oben abnimmt und zwar ist die Abnahme der Konzentration mit der Höhe der Masse der Teilchen proportional (Perrin), weshalb sich aus der Messung des Konzentrationsabfalles das Teilchengewicht berechnen läßt. Durch Anlegung eines Zentrifugalfeldes d. h. Vergrößerung des Schwerfeldes lassen sich die Konzentrationsdifferenzen auch in kleinen Höhen messen und zwar durch Fenster hindurch in der erschütterungsfrei laufenden Zentrifuge auf optisch-photographischem Wege. (U. V. Adsorption oder Refraktion.) Der andere Weg ist die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit in sehr schnell laufenden Zentrifugen (Ultrazentrifugen), welche die Erdbeschleunigung auf das Einmillionenfache zu erhöhen gestatten. Ein gewisser Nachteil ist, daß die Sedimentationsgeschwindigkeit auch von der Teilchenform (z. B. kugelförmig oder gestreckt stäbchenförmig) abhängig ist.

Als Ergebnisse dieser neuen, eleganten Methode sind nun folgende zu verzeichnen. Als erstes zeigte sich, daß die meisten Proteine völlig gleichmäßig sedimentierten, was nur möglich ist, wenn alle Teilchen gleiche Größe besitzen. Im Gegensatz zu den synthetischen Hochpolymeren, welche sich als Gemische von verschiedenen Molekulargewicht erweisen, also polydispers sind, erweisen sich die Proteine als molekular einheitlich, also monodispers. Die einzelnen Teilchen einer Proteinlösung haben gleiche Größe und diese bleibt auch erhalten, wenn das Protein mehrmals „umkristallisiert“ wird. Aus diesen überraschenden Feststellungen läßt sich schließen, daß der Aufbau der Proteinmoleküle nicht, wie bei synthetischen Produkten, statisch, sondern nach strengen Gesetzmäßigkeiten vor sich

geht. Weiter zeigte sich, daß die meisten Proteine Molekular-(Teilchen-) Gewichte besitzen, die ein Vielfaches von 34 500 sind, also $M = n \times 34\,500$, wobei n von 1 bis 192 schwanken kann, unter Umständen aber auch einen Bruchteil z. B. $\frac{1}{2}$ annimmt. Beispiele:

Lactalbumin	M =	17 600	n =	$\frac{1}{2}$
Pepsin	M =	39 000	n =	1
Insulin	M =	35 000	n =	1
Haemoglobin, Serumalbumin	M =	68 000	n =	2
Serumglobulin	M =	103 000	n =	3
Amandin, Excelsin, Edestin, Legumin	M =	208 000	n =	6
Katalase	M =	250 000	n =	8
Haemocyanin, Urease	M =	450 000	n =	16
Antipneumococcen-serum-Globulin	M =	910 000	n =	24
Haemocyanin (<i>Helix pomatia</i>)	M =	6 700 000	n =	192

Daß die meisten der verbreiteten Proteine einfache Vielfache, nämlich das Doppelte, Dreifache, Vier- und Sechsfache einer Grundeinheit von $M = 34\,500$ sind, läßt darauf schließen, daß die Proteine irgendwie nach einem gemeinsamen Prinzip gebaut sind.

Weiterhin war die Feststellung von besonderem Interesse, daß die meisten Proteine nur innerhalb einer gewissen pH-Zone stabil sind. Überschreitet man die pH-Stabilitätszone, so zerfallen die Proteine in kleinere Bruchstücke z. B. Proteine mit einem Mol.-Gew. von 208 000 in Stücke mit M. G. von 1,2 oder 3 mal 34 500. Dieser Zerfall ist reversibel d. h. bei Zurückgehen in den pH-Stabilitätsbereich wird die ursprüngliche Molekulargröße regeneriert. Die Verhältnisse gleichen also stark jenem, die Sørensen zur Schlußfolgerung von den reversibel dissoziablen Komponentensystemen als Ausdruck des Wesens des Proteinmoleküles veranlaßte. Pedersen nimmt an, daß die Grundteilchen von 34 500 Mol.-Gew. stabile Moleküle sind, welche durch andersartige Bindungen, gegebenen Falles von Nichteiweißnatur als Kittsubstanz zu höheren Einheiten verknüpft werden. Philippi schließt aus den Dimensionen der Aminosäureperioden in den Peptidketten, den Röntgendiagrammen und den von Bergmann entwickelten Hypothesen (s. o.), daß in den Grundeinheiten vom Mol.-Gew. 34—35 000 16 oder 18 Polypeptidketten enthalten sind. Daß diese und nicht andere Grundeinheiten gebildet werden, beruhe darauf, daß nur Komponentensysteme bestimmter Kettenzahlen stabil sind. Würden mehr Ketten in die Peptidschicht eines Komponentensystems eintreten, würden sie wieder abgestoßen werden, enthielte es weniger, so wäre das System nicht gesättigt und damit instabil.

Während der Abfassung dieser Darstellung erschien nun ein interessantes Buch von Pascal Jordan: Eiweißmoleküle, das zu den hier behandelten Fragen in richtungsweisender, wenn auch öfters vorläufig problematischer Form Stellung nimmt. Aus Jordans Ausführungen seien die wesentlichen Gedankengänge gebracht:

Die Proteine stellen genetisch und strukturell etwas anderes dar als es sonstige Hochpolymere wie Bakelite oder Ständingersche Kettenmoleküle sind, welche beide keine definierten Molekulargewichte besitzen. Diese Besonderheiten der Proteine sind im Zuge der recht bestehenden ganzzahliger Beziehungen von der Art $Z = 2^n \cdot 3^m$ zu erblicken, wie sie von Svedberg auf Grund der Ultrazentrifugenversuche am Molekulargewicht der Sphäroproteine erkannt, dann von Bergmann und Niemann in den stöchiometrischen Verhältnissen der Aminosäurereste in Proteinen aufgefunden und schließlich von Astbury in den röntgenographisch ermittelten Periodizitäten der Keratinmoleküle festgestellt wurden. Die Formel $N = 2^n \cdot 3^m$ für die Anzahl der Aminosäurereste im Proteinmolekül kann als Gesetz für alle natürlichen Proteine angesehen werden. Für Insulin ergibt sich z. B. $N = 292 \pm 10$, was als $288 = 2^5 \cdot 3^2$ gedeutet werden kann. Beim Keratinmolekül konnten Mc Arthur und Astbury längs der Kette Periodizitäten feststellen, welche einer Grundperiode von $L = 658$ Angströmeinheiten entspricht, was $384 = 2^7 \cdot 3^2$ Aminosäureresten gleich kommt.

Bei den Sphäroproteinen zeigten die Versuche von Svedberg, daß beim Überschreiten gewisser pH-Grenzen eine Aufspaltung der Proteine in 2 gleiche Hälften eintritt, doch an gewissen Proteinen auch Spaltungen in 4, 8 und 16 Teile, und in anderen Fällen auch solche in Drittel und Sechstel beobachtet worden sind. Die Grundspaltung in $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$ rechtfertigt nach Jordan die Vermutung, daß die Sphäroproteine einen Aufbau zeigen, in welchem jeweils $2^n \cdot 3^m$ kleinere Teile zu einem Gesamtmolekül vereinigt sind. Diese Vermutung wird gestützt durch die von Svedberg gefundene Tatsache, daß die Molekulargewichte der Sphäroproteine sich um gewisse Normalwerte häufen, welche ihrerseits zu einander ganzzahlige Verhältnisse der Gestalt $2^n \cdot 3^m$ zeigen.

Die Struktur, welche im Mittel ein Mol.-Gew. $M = 17\,600$ ergibt, nennt P. Jordan kurz die Svedbergstruktur. Ihr entspricht eine Zahl N der Aminosäurereste = 144.

Zur Deutung dieser ausgezeichneten Struktur weist nun Jordan darauf hin, daß sich die Bindungsweise der Teile zu einem Ganzen von den chemischen Valenzkräften sinnfällig unterscheiden müsse,

da diese nicht ausreichen, eine immer wieder in Erscheinung tretende Vereinigung mehrerer gleicher (oder fast gleicher) Teilstücke zu einem Ganzen zu erklären, denn chemische Bindungskräfte vermögen nur an den unmittelbaren Berührungsstellen zweier Moleküle oder Radikale zu wirken. Verfasser sieht nun eine Möglichkeit dieser im Proteinmolekül sich auswirkenden Bindungsart in quantenmechanischen Überlegungen gegeben, die für den Fall der Bindung von 2 oder 3 gleichen Teilen (nicht aber von 4 oder anderen Anzahlen) Resonanzanziehungen der Moleküle ergeben. Die Folgerung Jordans lautet: Zwischen 2 bzw. 3 gleich oder fast gleich strukturierten Molekülteilen kann dann eine „Resonanzanziehung“ auftreten, wenn sie so gelagert werden, daß das Ganze in Bezug auf eine zweizählige oder dreizählige Achse Symmetrie besitzt. Bei Aufreihung zu einem Stäbchen (gleiche Bausteine) kann nur Verdopplung der Stäbchenlänge, also zweizählige Symmetrieachse eintreten, sodaß $2^n \cdot 3^m = 2^n$ ist, während bei einer Verdreifachung dreizählige Symmetrie herrscht. Die Aminosäurereste in der Svedbergstruktur sind zwar nicht mehr einheitlich, werden aber in jedem Fall so verteilt sein, daß von der ursprünglichen Symmetrie noch möglichst viel gewahrt bleibt. Hierin erblickt Jordan die erstmalige Erklärung der Bergmann'schen stöchiometrischen Regel $2^n \cdot 3^m$.

Diese Überlegungen führen den Verfasser dazu, als kleinste über den Aminosäuren stehende Untereinheiten in der Svedbergstruktur Peptidringe, sogenannte Peptole in Übereinstimmung mit Bernal anzunehmen und zwar kommen nur Ringe mit 2 oder 3 Aminosäuren, also Dipeptole und Tripeptole in Betracht.

Es würde hier zu weit führen, nun auf alle die interessanten Schlußfolgerungen und Spekulationen einzugehen, welche Jordan an die Peptoltheorie knüpft. Durch Verdoppelung der Tripeptole auf dem Wege der Resonanzanziehung ergeben sich Doppeltripeptole, in welchen merkwürdige tautomere Umlagerungen, auf der Tautomerie des CO-NH Vierecks beruhend, stattfinden können, die zu Dreifach-Dipeptolen führen. Aus derartigen Tautomerieverhältnissen erklärt Jordan die große Variabilität der Proteine, ihr rasches, empfindliches Reagieren, Vorgänge der Nervenreizleitung u. a. m. Die Tripeptole werden als die letzten Einheiten der Svedbergstruktur angesehen und bedingen die Struktur der Sphäroproteine, die besser als Ringproteine zu bezeichnen wären. Sie sind die ursprünglichen Proteine, während die Kettenproteine, wie Keratine, Elastine, Fibroine als daraus abgeleitete „tote“ Abscheidungen des Protoplasmas aufgefaßt werden.

In wieweit sich die Vorstellungen Jordans auch auf die Denaturierung und den proteolytischen Abbau der Proteine auswirken, wurde bei den diesbezüglichen Abschnitten bereits erwähnt.

Aus den Messungen von Svedberg lassen sich rein rechnerisch eine Reihe von physikalischen Werten der Eiweißmoleküle ableiten. So ist z. B. das Volumen von 1 mg Protein $0,75 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$. Die Außenoberfläche von 1 mg Protein 10^4 cm^2 und der Radius eines Moleküles $r = 22,5$ Angströmeinheiten.

Eine sehr interessante Bestätigung dieser Werte brachten nun neuartige Versuche von Gortner und Grendel über die Spreitung der Proteine, worunter man die Ausbreitung von Stoffen in Form monomolekularer Filme auf Flüssigkeitsoberflächen versteht. Die Spreitung kommt dadurch zustande, daß die polaren Gruppen des Proteinmoleküles in die horizontale Oberfläche der Flüssigkeit (Wasser, Säurelösung) gezogen werden. Die Spreitungszahl, welche die im Versuch von 1 mg Substanz besetzte Oberfläche angibt, war für verschiedene Proteine gerade $1 \text{ m}^2 = 10^4 \text{ cm}^2$, was mit dem oben angegebenen Wert ausgezeichnet übereinstimmt, ebenso wie der aus dem Ergebnis des Spreitungsversuches berechnete Molekülradius von $r = 22 \text{ \AA}$.

Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen auf chemischem Wege lassen sich dadurch durchführen, daß einige Aminosäuren, ferner chemische Elemente wie Schwefel, Eisen, oder auch Atomgruppen nur in sehr geringen Mengen in Proteinen vorkommen. Läßt sich ausschließen, daß diese Stoffe keine Verunreinigungen sind, so läßt sich aus ihren quantitativ bestimmten Mengen das Molekulargewicht der Proteine unter der Voraussetzung, daß diese Stoffe nur einmal im Molekül vorkommen, nach

$$M = \frac{\text{Gruppengewicht} \times 100}{\% \text{ Gehalt}}$$

berechnen, und zwar ergeben sich damit Mindestmolekulargewichte. Beim Haemoglobin kommt man für 1 Atom Eisen zum M. G. 16 bis 17 000, für 1 Arginin nur zu M. G. 4 000, jedoch zwingt die S-Bestimmung zu M. G. 33 000. Einige Beispiele für Mol.-Gewichte:

	osmometrisch	Ultrazentrifuge	chemisch
Eialbum	35 000	34 000	33 800
Haemoglobin	67 000	68 000	33 500
Casein	—	75 000	98 000
Peroxydase	—	44 000	44 100

In vielen Fällen liegen die chemisch ermittelten Mol-Gewichte beträchtlich tiefer als die physikalisch ermittelten.

Außer der Größe hat man die Gestalt der Proteinteilchen zu ermitteln versucht. Bei dem mehrfach erwähnten Bauprinzip der Proteine aus vielen Aminosäuren können lange eindimensionale Ketten, zweidimensionale Netze oder dreidimensionale längliche oder kugelige Gebilde entstehen. Um über die Teilchengestalt eine Auskunft zu erhalten, können einige physikalische Methoden, nämlich Viscosität, Strömungsdoppelbrechung, Verhalten in der Ultrazentrifuge und Röntgenographie in festem Zustand herangezogen werden.

Für die viscosimetrische Messung dient als Grundlage das Einsteinsche Gesetz, wonach die spez. Viscosität η spez. bei der Konzentration = 1 im Falle kugeligter Teilchen den Wert $0,025 \times$ Dichte der Substanz unabhängig von der Teilchengröße besitzt. Bei kettenförmigen Molekülen dagegen gilt das Gesetz von Staudinger: die spez. Viscosität bei der Konzentration 1 ist direkt proportional der Länge der Teilchen. Aus durchgeführten Viscositätsmessungen ergab sich z. B. daß Ovalbumin und Haemoglobin kugelige, Pseudoglobulin, Serum-Albumin und Gelatine gesteckte Form der Teilchen aufweisen.

Strömungsdoppelbrechung tritt auf, wenn in Lösungen mit Teilchen länglicher Form ein Strömungsgefälle erzeugt wird und zwar ist der Effekt um so größer je länger die Teilchen sind. Nach Messungen von Boehm und Signer sind kugelige Proteine: Eialbumine, Myogen, kurze Stäbchen: Gelatine, lange Fäden: Myosin, überlange Fäden: Euglobulin.

Bei der Berechnung des Mol-Gewichtes aus der Sedimentationsgeschwindigkeit nach der Ultrazentrifugenmethode läßt sich aus der Größe eines mit der inneren Reibung zusammenhängenden Dissymetriefaktors das Achsenverhältnis der Moleküle berechnen. Eialbumin, Pepsin, Insulin und Haemoglobin erwiesen sich als kugelig, Zein, Serumalbumin, Serumglobulin als langgestreckt.

Im Elektronenmikroskop ließen sich Stäbchen des Tabakmosaikvirus sowie kugelige Formen des Haemocyanins (Mol. G. 6,7 Millionen) unmittelbar sichtbar machen.

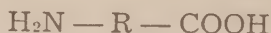
Bei unlöslichen Proteinen lassen sich aus den Röntgen Schichtlinien oder Debeye - Scherer - Diagrammen Schlüsse auf Symmetrie und Größe der Elementarzelle ziehen. Seidenfibroin erwies als gestreckte Anordnung der Aminosäuren und der Elementarkörper enthält je 4 Reste von Alanin und Glycocoll. Bei Keratin stellte

Astbury fest, daß die Peptid-Ketten stark verkürzt sind (5,1 statt 7 Å), daß aber beim Dehnen in heißem Dampf eine Streckung eintritt. Ähnliche Verhältnisse fand man auch bei den Proteinen von Muskeln und Sehnen.

3. Elektrolytische Dissoziation.

Es ist seit langem bekannt, daß die Proteine mit Säuren und Laugen zu reagieren vermögen, was sich durch pH- und Leitfähigkeitsmessungen nachweisen läßt. Die Proteine verhalten sich ähnlich wie ihre Bausteine, die Aminosäuren, sie stellen amphotere Elektrolyte dar. Bedingt wird diese Eigenschaft durch das Vorhandensein von Molekülgruppen im Protein, die entweder Säuren oder Basen zu binden vermögen. Als solche Gruppen kommen in erster Linie COOH- und NH₂-Gruppen in Betracht. Je nachdem die Carboxylgruppen, bedingt durch Überwiegen von Dicarbonsäuren, oder die Aminogruppen durch Überwiegen der Diaminosäuren vorherrschen, kann das Protein einen mehr sauren oder mehr alkalischen Charakter in seiner Gesamtheit nach außen besitzen. Dementsprechend geht das Säurebildungsvermögen eines Proteins seinem Prozentgehalt an basischen Aminosäuren und sein Basenbindungsvermögen seinem Prozentgehalt an Monoaminodicarbonsäuren parallel. Mit salpetriger Säure desaminierte Proteine besitzen in Übereinstimmung mit diesen Vorstellungen ein stark reduziertes Säurebindungsvermögen.

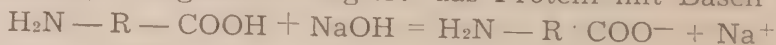
Im elektrochemischen Verhalten der Proteine spielt nun der sogenannte isoelektrische Punkt eine bedeutende Rolle. Das Wesen des isoelektrischen Punktes kann man sich durch folgende schematische, oft gebrauchte Vorstellung verständlich machen. Ein weitgehend durch Dialyse von Elektrolyten (Säuren, Basen, Salzen) gereinigtes Protein von amphoteren Eigenschaften kann man durch das Symbol:



versinnbildlichen. Die Reaktion des Proteins mit Säuren verläuft dann schematisch folgendermaßen:



d. h. die Aminogruppe reagiert mit der Säure unter Bildung des stark dissoziierten Ammoniumsalzes. Da im Protein mehrere solcher Aminogruppen vorhanden sind, entsteht unter dem Einfluß der Säure ein polyvalentes Proteinkation (positiv geladenes Säureeiweiß). Umgekehrt reagiert das Protein mit Basen analog:



In diesem Falle entsteht ein polyvalentes Proteinanion (negativ geladenes Baseneiweiß).

In der wässerigen Lösung eines weitgehend gereinigten Proteins ist seine elektrolytische Dissoziation eine sehr geringe und je nach dem Vorwiegen der Amino- oder Carboxylgruppen eine mehr positive oder mehr negative. Überwiegen z. B. die Carboxylgruppen, so läßt sich nach physikalisch-chemischen Gesetzen die an sich schwache Dissoziation der Carboxylgruppen durch Zusatz geringer Mengen von Säuren weiter zurückdrängen, wobei ein Punkt erreicht wird, in welchem zahlenmäßig die Dissoziation der Carboxylgruppen jener der Aminogruppen gleich groß und damit das Proteinmolekül elektrisch neutral wird. Diesen Punkt heißt man den isoelektrischen Punkt (I. P.) und charakterisiert ihn nach Michaelis durch die Beziehung

$$\text{I. P.} = [\text{H}^+] = \sqrt{\frac{k_a}{k_b} \times k_w}$$

Der isoelektrische Punkt eines Proteins liegt also bei derjenigen Wasserstoffionenkonzentration der Lösung, die numerisch der Quadratwurzel aus

Säuredissoziationskonstante (k_a)
 Basendissoziationskonstante (k_b) $\times$ Dissoziat. konst. des Wassers (k_w)
 entspricht.

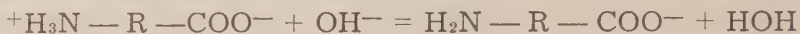
Diese hier entwickelten Vorstellungen gehen hauptsächlich auf die grundlegenden Arbeiten von L. Michaelis zurück und sind geeignet, das elektrochemische Verhalten der Proteine und die daraus sich ableitenden Folgerungen bezüglich verschiedener Eigenschaften (s. u.) in befriedigender Weise verständlich zu machen.

Nun ist aber in neuerer Zeit noch eine andere Theorie über den isoelektrischen Punkt und die elektrolytische Dissoziation der Proteine entwickelt worden, die in allen neueren Arbeiten angenommen ist und sich durchgesetzt hat, sodaß sie hier kurz Erwähnung finden muß, obwohl, wie vorausgeschickt sei, die neue Theorie allgemein äußerlich betrachtet, nichts an den bisherigen Vorstellungen ändert, jedoch in wissenschaftlicher Beziehung, insbesondere bei subtilen physikalisch-chemischen Berechnungen (z. B. Säure- und Basendissoziationskonstanten), den Verhältnissen völlig gerecht wird. Die neue Theorie geht zurück auf die grundlegenden Arbeiten von Niels Bjerrum über die elektrolytische Dissoziation der amphoteren Elektrolyte. Darnach sind Ampholyte wie die Aminosäuren im isoelektrischen Punkt und in der Umgebung des

Neutralpunktes (pH 7) in wässriger Lösung nicht, wie man früher annahm, als undissoziierte Moleküle, sondern fast ausschließlich als Zwitterionen aufzufassen. Die einfachste Aminosäure, das Glycocoll, würde also nicht in der Form $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$, sondern als Zwitterion $^+\text{H}_3\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$ vorliegen. Das gleiche gilt nun auch für die aus Aminosäuren aufgebauten Proteine. Die Reaktion eines Eiweißkörpers mit Säuren hat man, wie oben erörtert als eine Dissoziation der Aminogruppe, also als eine Betätigung der basischen Eigenschaften aufgefaßt, während sie nach der neuen Theorie als eine Zurückdrängung der Dissoziation der COOH -Gruppe betrachtet wird, also folgendermaßen zu formulieren ist:



Die Reaktion der Proteine mit Natronlauge wurde bisher als Reaktion der Carboxylgruppe aufgefaßt, während sie nunmehr als Zurückdrängung der Dissoziation der Aminogruppe folgendermaßen zu formulieren ist:



Mit wachsender Azidität würde dann nach erfolgter Rückdrängung der Carboxylgruppendissoziation eine Überführung der Aminogruppen unter Aufnahme von Protonen in die Ammoniumform ($\text{NH}_2 + \text{H}^+ = \text{NH}_3^+$) erfolgen und im Überschuß von Basen würde nach Zurückdrängung der Aminogruppendissoziation (Abgabe von Protonen) die Carboxylgruppe unter Salzbildung reagieren. Stärkere Säuren führen wie nach der alten Theorie das Eiweiß in positive Proteinkationen, stärkere Laugen in negative Proteinanionen über. Der theoretische Unterschied ist nur der, daß die scheinbaren Säuredissoziationskonstanten eines Proteins in Wirklichkeit Hydrolysenkonstanten der basischen Gruppen und umgekehrt die scheinbaren basischen Dissoziationskonstanten Hydrolysenkonstanten der sauren Gruppen sind.

Die neue Theorie ist durch eine größere Anzahl unwiderleglicher und überzeugender Beweise, auf die hier nicht eingegangen werden kann, begründet und fest fundiert worden. Sie hat auch allgemeine Annahme gefunden.

Nun wieder zum isoelektrischen Punkt zurückkehrend, bleibt zu erörtern, in welcher Weise sich die Eigenschaften der Proteine bei Erreichung desselben vor jedem anderen pH — Bereiche unterscheiden. Nachdem im I. P. die positiv und negativ geladenen Ionen sich die Waage halten, wandern die Proteinteilchen im elektrischen Feld entweder nicht oder mit sehr geringer Geschwindig-

keit nach beiden Elektroden. Bei Entfernung vom I. P. tritt dagegen eine ausgesprochene anodische oder kathodische Wanderung der Porteilchen ein. Die Bestimmung der elektrophoretischen Geschwindigkeit dient als eine der exaktesten Methoden zur Bestimmung des I. P. eines Proteins. Ein sinnreich konstruierter Apparat wurde für solche Zwecke von Tiselius konstruiert, in welchem die Bewegungsgrenzschichten der Proteinlösung mit Hilfe von U. V. Licht photographisch sehr genau bestimmt werden können. Oder man suspendiert schwer lösliche Partikel in der Proteinlösung. Die Partikel überziehen sich durch Adsorption mit einem Film des Proteins und nehmen damit oberflächlich die Eigenschaften des Proteins an, sofern der Film die suspendierten Teilchen völlig umhüllt. Ist dies der Fall, so spielt die Natur der Teilchen z. B. Paraffinemulsionen, Quarzsuspensionen etc. keine Rolle mehr, die Teilchen benehmen sich so, als ob sie nur aus dem Protein bestünden, ihre Wanderungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH dient zur Bestimmung des I. P.

Im I. P. erfährt weiterhin die Löslichkeit der Proteine eine charakteristische Entwicklung und zwar weist sie ein Minimum auf. Eine Reihe von Proteinen sind im I. P. unlöslich z. B. Casein, Euglobulin, Fibrin, ferner denaturierte Proteine, oder an sich lösliche Proteine, wie Albumine, Glutin, Haemoglobin, manche Globuline weisen im I. P. eine geringere Lösungsstabilität auf, sodaß sie z. B. durch Zusatz dehydratisierender Lösungsmittel wie Alkohol oder Azeton unter gleichen Konzentrationsbedingungen im I. P. bedeutend leichter und stärker als in anderen pH — Bereichen ausgeflockt werden. (Maximum der Alkoholfällbarkeit.) Im I. P. tritt auch die Hitzedenaturierung am vollkommensten ein. Nachdem im isoelektrischen Punkt außer der Aequivalenz von positiven und negativen Ladungen die ungeladenen neutralen Moleküle, die man sich durch Bildung innerer Salze zwischen NH_3^+ und COO^- Gruppen entstanden denken kann, ein Maximum erreichen, besitzt im I. P. der osmotische Druck und die Viscosität ein Minimum, während die Oberflächenspannung ein Maximum aufweist.

Die Lage des I. P. der einzelnen Proteine hängt natürlich enge mit ihrem konstitutionellen Aufbau zusammen. Ein Beweis sinnfälliger Art ist die Tatsache, daß chemische Eingriffe, welche die Konstitution des Proteins verändern, die Lage des I. P. verschieben. Zusatz von Alkohol, der die Dissoziation der Carboxylgruppen mehr als jene der Aminogruppen verringert, ruft eine Verschiebung des I. P. in Richtung alkalischer Reaktion hervor. Andererseits be-

wirkt Zusatz von Formol die Überführung der NH_2^- in die tausendmal schwächer basischen $\text{N} = \text{CH}_2$ -Gruppen und damit starke Verschiebung des I. P. nach der sauren Seite, ebenso wirkt die Desaminierung der NH_2 -Gruppen mit salpetriger Säure, oder wenn Sulfongruppen ins Eiweißmolekül eingeführt werden.

Die Konstitutionseinflüsse zeigen sich weiter in der analytisch ermittelten Zusammensetzung der Bausteine eines Proteins auf die Lage seines I. P. Casein z. B. mit seinem höherem Gehalt an Dicarbonsäuren (Asparagin-, Glutamin- und Oxyglutaminsäure) im Vergleich mit demjenigen an Diaminosäuren (Lysin, Arginin, Histidin) hat I. P. = 4,7, während Clupein, ein Protein das hauptsächlich aus Arginin aufgebaut ist, hat einen I. P. = 13,4.

Darüber hinaus spielt aber auch die feinere Struktur, die sich in der Verteilung der ionogenen Gruppen sowie in der Gegenwart von Substituenten kund gibt, eine Rolle. Positiv geladene Amino-Guanidin- und Imidazolgruppen erhöhen z. B. durch Abstoßung der OH^- Ionen die Dissoziation der Carboxylgruppen, welche ihrerseits infolge ihrer negativen Ladung OH^- -Ionen abstoßen und damit die Dissoziation der basischen Gruppen fördern. Diese Wirkungen sind auf elektrostatische Kräfte zurückzuführen, welche mit Hilfe des Lösungsmittels ihren Einfluß ausüben.

Weiter machen sich deformierende Kräfte geltend, welche ihren Einfluß durch das Molekül hindurch ausüben. Elektronen anziehende Gruppen (COOH^- , C_6H_5^- , C_6H_4^- , OH^- , SH^- , CO NH_2^-) ebenso die elektronegative Peptidbindung erhöhen die Freimachung von H-Ionen und vergrößern damit die Dissoziationskonstante der Carboxylgruppen, während sie die der basischen Gruppen verringern. Der Effekt dieser Substituenten ist additiv, aber abhängig von ihrem Abstand von den ionogenen Gruppen.

Aus all dem Gesagten wird verständlich, daß der isoelektrische Punkt für jedes einzelne Protein einen von seiner Konstitution abhängigen charakteristischen Wert besitzt. Einige Beispiele enthält folgende Tabelle:

I. P. von Proteinen.

Gelatine	4,7	Wolle	4,9
Serumalbumin	4,99	Protamin	12,0
Serumglobulin	4,4	Globin	8,1
Casein	6,4	Histon	8,5
Edestin	6,9	Seide	5,1
Ovalbumin	4,6		
Gerstenalbumin	4,6		

4. Säure- und Basenbindung.

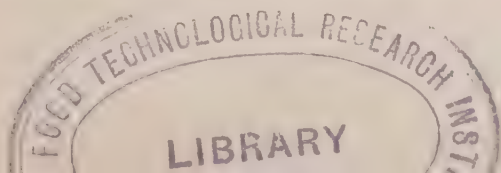
Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erläutert wurde, sind die Proteine als Ampholyte befähigt, sowohl Säuren als auch Laugen unter Bildung von polyvalenten Proteinionen zu binden. Von kolloidchemischer Seite wurde diese Säure- und Basenbindung als ein dem Adsorptionsgesetz folgender Vorgang gedeutet, jedoch haben die neueren Untersuchungen von Sörensen, Wo. Pauli, Michaelis, Loeb, Tillmans gezeigt, daß einer rein chemischen Auffassung dieses Bindungsvermögen der Vorzug zu geben ist.

Um die obwaltenden Verhältnisse durch ein Beispiel anschaulicher zu gestalten, sei ein Beispiel aus einer neueren Veröffentlichung von Wo. Pauli (Hevet. Chim. Acta. 28. 1426) gebracht. Zum Versuch diente weitgehend durch Elektrodialyse gereinigtes Serumalbumin von einem Mol.-Gew. — 70 000. Eine 1%ige Lösung dieses Albumins hat ein pH = 5,27, woraus sich eine Wasserstoffionenaktivität $aH = 5,37 \times 10^{-6}$ berechnet. Die Viscosität der Lösung beträgt $\eta = 1.054$. Werden nun dieser Lösung steigende Mengen verdünnter titrierter Salzsäure zugesetzt, so ergeben sich folgende Änderungen:

$n \text{ HCl} \times 10^3$	aH	$n^{III} \times 10^3$	LZ	η
1,0	$2,95 \times 10^{-5}$	0,97	6,79	—
1,75	$5,50 \times 10^{-5}$	1,69	11,85	1,075
3,0	$1,12 \times 10^{-4}$	2,88	20,16	1,112
5,0	$2,18 \times 10^{-4}$	4,77	33,97	1,194
7,5	$5,75 \times 10^{-4}$	6,88	48,16	—
10,0	$1,02 \times 10^{-3}$	8,89	62,23	1,354
15	$3,04 \times 10^{-3}$	11,6	81,2	1,420
20	$6,17 \times 10^{-3}$	13,04	91,31	1,396
30	$1,43 \times 10^{-2}$	13,66	95,62	1,325
40	$2,24 \times 10^{-2}$	14,25	99,75	1,253
50	$3,06 \times 10^{-2}$	14,55	102,2	1,212

(14,7) (103,6)

Aus dem Verlauf der Protonaufnahme des Serumalbumins mit steigendem HCl-Zusatz läßt sich die maximale Aufnahme für je 1 g Protein ausgedrückt in Normalität n^{III} mit 148×10^{-5} und aus dem Mol.-Gew. $\sim 70\,000$ die maximale Wertigkeit oder Ladungszahl des positiven Albuminions LZ mit 103 je Teilchen bestimmen. Wie man aus der Tabelle ersehen kann, steigt mit zunehmenden HCl-Zusatz die Protonaufnahme (n^{III}) zuerst kräftig, dann immer weniger an, um sich schließlich allmählich dem maximalen Grenzwert zu nähern. Gleichzeitig steigt mit dem Säurezusatz die La-



dungszahl zuerst gleichmäßig stark, später schwächer an, womit zum Ausdruck kommt, daß durch die Protonaufnahme eine fortschreitende (positive) Aufladung zu polyvalenten Proteinionen erfolgt. Einen andersartigen Verlauf nimmt die Viscosität η , welche unter starkem Anstieg bei 0,015 n HCl ein Maximum erreicht, um dann allmählich wieder abzufallen. Im η -Optimum des 1%igen Serumalbumins, das bei 0,015 n HCl liegt, ist nur 116×10^{-5} n je 1 g Protein, also ca. 79% der möglichen Höchstaufnahmen an H^+ , gebunden, was einer Ladungszahl von ~ 80 je Teilchen entspricht. Das Optimum des Viscosität η fällt nun, wie Pauli und Mitarbeiter in zahlreichen Versuchen zeigen konnten, mit dem Maximum der Aktivität des sogenannten Gegenions (Cl^-) im Proteinsalz zusammen, die sich durch potentiometrische Bestimmung ermitteln läßt. Nach den Gesetzen der Elektroneutralität muß in einem System den positiven Ladungen eine äquivalente Menge negativer Ladungen gegenüber stehen. Bei Verwendung von HCl werden die positiven H^+ oder Protonen vom Protein unter Bildung von Proteinkationen aufgenommen, während die negativen Cl^- -Ionen die Gegenionen bilden. Weiterhin fällt das η -Optimum mit dem Optimum der auf das Proteinsalz entfallenden Leitfähigkeit κ zusammen.

Ganz ähnliche Verhältnisse ergeben sich auch bei der Reaktion eines Proteins mit Basen. Auch hier steigt die Normalität, die Ladungszahl und die Viscosität mit zunehmender Bindung von Lauge und damit steigender Bildung von polyvalenten Proteinanionen bis zur Erreichung eines Höchstwertes an. Auch die Viscositätskurve zeigt die Merkwürdigkeit nach Erreichung eines Höchstwertes wieder, wenn auch schwächer als auf der sauren Seite abzufallen. Mit dem Umschlagen des Verlaufes der η -Kurve geht übrigens auch eine Änderung im Gange der spezifischen Drehung $[a]_D$ des Proteins einher. Auf die Deutung des durch die verschiedenen physikalisch-chemischen Messungen erschlossenen Phaenomene wird weiter unten eingegangen. Hier soll kurz noch gezeigt werden, wie sich die mit Säuren und Laugen an den verschiedenen Proteinen erhaltenen Resultate zur Aufklärung der ihnen zugrunde liegenden Struktur auswerten lassen. Zur Illustrierung diene folgende einer kürzlich von Wo. Pauli veröffentlichten zusammenfassenden Arbeit entnommene Tabelle (Helv. Chim. Acta 30. 79, 1946).

Protein	M Gw.	$n^{III} \times 10^5$		$\frac{\text{neg}}{\text{pos.}}$	gr. J.P.	Eig. PH	L_Z^+	L_Z^-
		maxim. Aufn.	Proton.- Abgabe					
Ovalbumin	44 000	100	134	1,22	4,6	4,74	48	59
Seralbumin	72 000	148	159	1,08	4,99	5,34	103	110
Pseudoglob.	167 000	148	126	0,9	6,00	5,79	247	213
Haemoglob.	69 000	156	127	0,81	6,9	6,97	108	87

Diese Tabelle enthält neben den Molekulargewichten die Höchstwerte von n^{III} für Säurebindung (= Protonaufnahme), wie für Basenbindung (Protonabgabe), die daraus abgeleiteten maximalen Ladungszahlen L_Z^+ und L_Z^- je Eiweißteilchen, welche mit dem Molekulargewicht anwachsen, die Relation der negativen zu den positiven Gruppen, die isoelektrischen pH-Werte IP für 0,5%ige Lösungen in 0,005 n Azetatpuffer, sowie die H⁺-Aktivitäten der zugehörigen elektrolytfreien Lösungen.

Ovalbumin und Serumalbumin erweisen sich demnach entsprechend den Höchstzahlen von n^{III} als mehr negative, Pseudoglobulin und Haemoglobin als mehr positive Proteine. Damit findet sich auch ein gewisser Parallelismus im Gang der isoelektrischen Reaktion, sowie der Eigen-H⁺-Aktivität mit dem Verhältnis der optimalen sauren (negativen) Gruppen zu den basischen (positiven) der Proteine, indem sich I. P. und Eigen-pH mit relativer Zunahme der positiven Gruppen in Richtung zunehmender pH-Werte verschieben. Es liegt nach allem, was bisher über die Konstitution der Proteine bekannt wurde, nahe, ihr Säurebindungsvermögen mit ihrem Gehalt an den drei Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin, und ihr Basenbindungsvermögen mit ihrem Gehalt an Dicarbonsäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure und β -Oxyglutaminsäure in Zusammenhang zu bringen. Als Gruppe sauren Charakters kommt auch das phenolische Hydroxyl des Tyrosins in Betracht. Pauli und Valkó machen zu diesem Problem folgende Ausführungen: „Vielleicht könnte die Gesetzmäßigkeit besser darauf beschränkt werden, daß die verfügbaren seitenständigen Diaminogruppen den oberen Grenzwert des Säurebindungsvermögens darstellen, wovon jedoch bei manchen Proteinen z. B. Haemoglobin nur ein Bruchteil tatsächlich in Reaktion treten kann. Es wäre weiter in Betracht zu ziehen, wieweit durch gegenseitige peptidartige, cyclische Absättigung zwischen Diamino- und Dicarboxylsäuren (gemeint ist hier die Möglichkeit der inneren Salzbildung d. Verf.) die Anzahl der freien Gruppen vermindert wird. Andererseits sind im Falle kürzerer Hauptvalenzketten auch die Endgruppen der Ketten zu berücksichtigen.

(gemeint sind die freien endständigen Amino- und Carboxylgruppen von Peptidketten. d. Verf.) Auf alle Fälle bleibt der konstitutive Nachweis wertvoll, daß für die H^+ - und OH^- -Bindung auch bei der Annahme von peptidartigen Hauptvalenzketten genügend reaktionsfähige Gruppen übrig bleiben.“

Die für die einzelnen Proteine charakteristischen Säure- und Basenbindungsverhältnisse werden am besten durch Titrationskurven erschlossen, wie sie im Brauereilaboratorium als Pufferungskurven bekannt sind. Es werden also die Proteine in wässriger Lösung mit verdünnter Salzsäure einerseits und verdünnter Natronlauge andererseits titriert und jeweils die zugehörigen pH-Werte gemessen. Trägt man von der $pH = 7,0$ Abszisse als Null-Linie auf der Ordinate nach oben die ccm Na OH, nach unten die ccm H Cl und auf der Abszisse die pH Werte von 0 bis 14 auf so erhält man eine pH-Titrationskurve, deren charakteristischer Verlauf von verschiedenen chemischen Gruppen im Proteinmolekül verursacht wird. So enthält nach Simms Gelatine saure Gruppen mit Titrationsindices bei $pH\ 2,9—3,5$, die quantitativ mit ihrem Gehalt an Aminodicarbonsäuren übereinstimmen. Bei Eialbumin liegt bei $pH\ 9,4$ eine saure Gruppe vor, deren Menge dem Tyrosingehalt des Proteins entspricht, Lysin und Histidin in beiden Proteinen stimmen quantitativ mit basischen Gruppen bei $pH = 6,1$ bzw. $10,4—10,6$ überein. Es zeigt sich also, daß das Säure- und Basenbindungsvermögen der Proteine auf charakteristische chemische Gruppen zurückgeführt werden kann.

5. Verhalten der Proteine im elektrischen Strom. Schon bei der Erörterung des isoelektrischen Punktes wurde darauf hingewiesen, daß die Proteinteilchen je nach der Art ihrer elektrischen Aufladung sei es als Kationen, Anionen oder Zwitterionen entsprechend im elektrischen Stromgefälle wandern oder wie bei Zwitterionen im isoelektrischen Punkt keine Wanderung oder eine schwache nach beiden Elektroden gerichtete zeigen. Auch wurden bereits einige Angaben über die Methoden (Tiselius) gemacht, nach welchen die Wanderungsgeschwindigkeit und die Wanderungsrichtung festgestellt werden kann. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines kolloiden Teilchens wird durch das elektrokinetische Potential bestimmt, worunter man das Potential der das Teilchen umgehenden und gegen die Flüssigkeit abgrenzenden Doppelschicht versteht. Es kann aus den gemessenen Wanderungsgeschwindigkeiten bestimmt werden. Die elektrokinetischen Potentiale sind für die von J. Loeb nach einer originellen Methode an Proteinlösungen erhaltenen Membranpotentiale von Interesse (siehe später).

Ebenfalls von Loeb aber auch von anderen Forschern wurden die elektrischen Leitfähigkeitswerte von Proteinlösungen unter dem Einfluß von Säuren, Laugen und Salzen gemessen, woraus sich im Zusammenhalt mit anderen physikalischen Messungsergebnissen wertvolle Schlüsse auf die Ladungs- und Jonisationsverhältnisse der Proteinionen ziehen ließen.

E. Proteine als Kolloidelektrolyte

Die bisher besprochenen Eigenschaften der Proteine ließen bereits erkennen, daß eine Reihe derselben auf das hohe Molekulargewicht der Proteine und damit ihr Auftreten im kolloiden Zustand, eine andere Reihe von Eigenschaften auf ihre Dissoziation als amphotere Elektrolyte zurückzuführen ist. Die Proteine vereinigen beide Charakteristika: sehr großes Molekulargewicht, und hohe elektrische Aufladung in einem Maße wie wenige andere polymere Naturstoffe. Man darf aber diese Kombination der beiden Eigenschaften auch wohl als die tiefere Ursache für die außerordentliche Variabilität und Labilität betrachten, deren die Proteine z. B. in Abhängigkeit vom pH des umgebenden Mediums fähig sind. Weiter äußert sich die Kolloidelektrolytnatur der Proteine in einer Anzahl charakteristischer physikalisch - chemischer Phaenomene, wie den Donnan-gleichgewichten und Membranpotentialen, dem osmotischen Druck, der Viscosität, der Quellung, der Einwirkung von Neutralsalzen, der Symplexbildung, die nicht nur rein phaenomenologisch von Interesse sind, sondern auch für die mit den Proteinen im Organismus verknüpften physiologischen Verhältnisse von Bedeutung sind. Im Folgenden sollen, soweit noch nicht behandelt, die genannten Erscheinungen einer kurzen Besprechung unterzogen werden.

1. Donnan-gleichgewicht und Membranpotential.
Wenn auf der einen Seite einer nur für Elektrolyte durchlässigen Membran sich eine Salzlösung z. B. Na Cl, auf der anderen Seite derselben ein Kolloidelektrolyt z. B. Na R (Na-Proteinat) befindet, der die Membran nicht zu durchwandern vermag, so tritt eine Diffusion von Na Cl von der einen nach der anderen Seite der Membran ein, bis ein Gleichgewicht eingetreten ist. Schematisch läßt sich der Zustand zu Beginn und nach Erreichung des Gleichgewichtes folgendermaßen darstellen:

Bei Beginn	
Na ⁺	Na ⁺
R ⁻	Cl ⁻
(1)	(2)

im Gleichgewicht	
Na ⁺	Na ⁺
R ⁻	
Cl ⁻	Cl ⁻
(1)	(2)

Wäre kein Kolloidelektrolyt auf Seite (1) zugegen, so würden sich die Konzentrationen auf beiden Seiten durch Diffusion ausgleichen, bis rechts und links die gleichen Konzentrationen positiv und negativer Ionen herrschen. Ist jedoch ein Kolloidelektrolyt R⁻ auf der einen Seite (1) vorhanden, so entsprechen diesem R⁻ einerseits Na⁺-Ionen, andererseits aber sind auch noch Natriumionen zugegen, welche den durch Diffusion eingewanderten Chlorionen entsprechen. Auf der anderen Seite der Membran befinden sich dagegen nur so viel Natriumionen als den gleichzeitig vorhandenen Chlorionen entsprechen. Bezeichnet man die Konzentration der Ionen in Mol/L mit eckigen Klammern und die Membranseiten mit den Indices 1 und 2, so herrscht nach Donnan nach Erreichung des Gleichgewichtes die Beziehung:

$$[\text{Na}^+]_1 : [\text{Na}^+]_2 = [\text{Cl}^-]_2 : [\text{Cl}^-]_1$$

oder mit anderen Worten, im Gleichgewicht ist das Produkt der Konzentration der Natrium- und Chlorionen auf beiden Seiten der Membrane das gleiche. Durch die Gegenwart des nicht diffusiblen Proteinanions auf der Seite (1) wird also erreicht, daß sich hier mehr Natriumionen befinden als auf der anderen Seite der Membran. Es ist also

$$[\text{Na}^+]_1 > [\text{Na}^+]_2 \quad \text{und ebenso umgekehrt}$$

$$[\text{Cl}^-]_1 < [\text{Cl}^-]_2$$

Die Bedeutung der Donnangleichgewichte liegt darin, daß durch die Anwesenheit von nicht diffussiblen Kolloidelektrolytionen Konzentrationsdifferenzen an Elektrolyten hervorgerufen werden, was physiologisch bei Systemen wie Blut und Kammerwasser, Blut und Liquor cerebrospinalis, Verteilung der Ionen zwischen Blutkörperchen und Plasma, Wanderung von Ionen durch Zellmembranen entgegen dem natürlichen Konzentrationsgefälle von Bedeutung ist. (Keimling — Endosperm, Hefeplasma und Außenflüssigkeit.)

Infolge der Konzentrationsdifferenz der Ionen auf beiden Seiten der Membrane kommt es zur Ausbildung von Membranpotentialen, deren Ableitung von Donnan mit Hilfe der Nernst'schen Formel durchgeführt wurde. Es erübrigt sich im Einzelnen hierauf einzugehen, sondern zur Beleuchtung der Verhältnisse möge ein Beispiel von J. Loeb genügen, welcher sich sehr eingehend mit den Mem-

branpotentialen nach Donnan von Proteinlösungen in Abhängigkeit von pH und Salkonzentration befaßte.

Einfluß des pH auf die Wasserstoffpotentiale und die Membranpotentiale von Gelatinechloridlösungen beim osmotischen Gleichgewicht.

100 ccm	(1%ige isoelektrische Gelatine)									
enth. ccm n/10 HCl	1	2	4	6	8	10	12,5	15	20	30
pH innen	4,56	4,31	4,03	3,85	3,33	3,25	2,85	2,52	2,13	1,99
pH außen	4,14	3,78	3,44	3,26	2,87	2,81	2,53	2,28	2,00	1,89
pH Differenz	0,22	0,53	0,59	0,59	0,46	0,44	0,32	0,24	0,13	0,10
H ⁺ -Potential M. V.	+24,7	31,0	34,5	34,5	27,0	25,8	18,8	14,0	7,6	5,9
Membranpotential m. V.	+24,0	32,0	33,0	32,5	26,0	24,5	16,5	11,2	6,4	4,8

Bei diesem Versuch wurde also durch pH-Messung die Konzentration der Wasserstoffionen in den Lösungen innerhalb und außerhalb der Membran nach Erreichung des Diffusionsgleichgewichtes ermittelt und aus der Differenz durch Multiplikationen mit dem aus der Nernst'schen Gleichung stammenden Faktor 59 das Wasserstoffpotential an der Membran berechnet. Andererseits wurde das Membranpotential nach Analogie der Konzentrationsketten mit Kalomelelektroden unmittelbar gemessen. Vergleicht man die Millivoltwerte der untersten Reihe mit jenen der vorletzten Reihe, so wird man eine sehr befriedigende Übereinstimmung feststellen, womit die Richtigkeit der von Donnan entwickelten Gesetzmäßigkeit bewiesen ist. Andererseits zeigten diese und viele andere Messungen von Jacques Loeb, daß sich mit Hilfe der Membranpotentiale in ganz analoger Weise wie mit anderen physikalischen Methoden der gleiche „Gang“ der Eigenschaften einer Proteinlösung in Abhängigkeit von pH und Elektrolytgehalt nachweisen läßt.

2. Osmotischer Druck.

Durch die Anwendung der von Donnan entwickelten Gesetzmäßigkeiten nämlich der Jonengleichgewichte und der Potentiale zu beiden Seiten einer Membrane auf die Messung des osmotischen Druckes von Proteinlösungen war eine exakte Auswertung derartiger Messungen erst möglich geworden. Sie wurden in einer großen Zahl sehr sorgfältiger Arbeiten von S. P. L. Sørensen, später auch von G. S. Adair vorgenommen.

Die Veränderungen, welche Eiweißlösungen unter dem Einfluß von Säuren, Basen und Salzen, in ihren Dissoziationsverhältnissen er-

fahren, werden in ihrem osmotischen Druck sinnfällig zum Ausdruck gebracht. Die erhaltenen Kurven mit ihrer typischen Maximumbildung und ihrem allgemeinen Verlauf gleichen jenen, wie sie auch mit Hilfe der Viscosität oder der Leitfähigkeit als Meßmethode erhalten werden.

3. Viscosität.

Auf die Viscosität als Meßmethode physikalisch-chemischer Veränderungen der Proteinmoleküle braucht hier nicht mehr eingegangen werden, nachdem weiter oben anläßlich des Säure- und Basenbindungsvermögens diese Methode ausführlich behandelt wurde. Am Schlusse dieses Kapitels wird im Zusammenhang mit theoretischen Erörterungen auch nochmals auf die Viscosität von Proteinlösungen eingegangen werden.

4. Quellung.

Werden bei einem hochmolekularen Stoff durch Hinzutritt von Wasser eine genügend große Zahl von hydrophilen Gruppen hydratisiert, so geht der Stoff gegebenen Falles unter Dissoziation in einfachere niedriger molekulare Spaltstücke in Lösung z. B. Albumin. Sind jedoch Gruppen im Molekül vorhanden, die von Wasser nicht hydratisiert werden und welche den Zusammenhalt der einfacheren Moleküle zu komplizierten Molekülgruppen besorgen, so kann der Fall eintreten, daß das Wasser unter Hydratation an die hydrophilen Gruppen herantritt, den ganzen Molekülverband lockert, ohne ihn jedoch so zu lockern, daß er in Lösung ginge. Eine solche Erscheinung tritt äußerlich als Quellung auf. Die Mengen an Quellungswasser, die in das Innere der Molekülverbände aufgenommen werden, können oft sehr erhebliche sein und ein Vielfaches des Trockengewichtes der ungequollenen Substanz erreichen. Ein Protein, an dem die Quellungerscheinungen viel studiert wurden, ist die Gelatine, auch der Kleber, ein Gemisch von Gliadin und Glutenin aus dem Weizen, ist ein geeignetes Versuchsobjekt. Zwischen der Viscosität einer Proteinlösung und der Quellung eines unlöslichen Proteins bestehen weitgehende Analogien. Die Quellung ist z. B. im isoelektrischen Punkt am geringsten, sie nimmt unter dem Einfluß von Säuren und Basen sehr stark zu (kann u. U. zur Lösung führen), Neutralsalze wirken entquellend, wobei auf Proteinkationen Salzanionen, auf Proteinanionen umgekehrt Kationen nach Maßgabe ihrer Wertigkeit reagieren.

Quellungserscheinungen sind für die im Organismus in unlöslicher Form vorhandenen Proteine z. B. in Geweben, Muskel von großer physiologischer Bedeutung, ebenso spielen sie für die Struktur und den kolloiden Zustand des halbflüssigen Protoplasmas eine wichtige Rolle.

5. Proteine und Neutralsalze.

Nicht nur zwischen Proteinen und Säuren und Basen herrschen enge Beziehungen, sondern auch die Neutralsalze vermögen mit den Proteinen in Gegenwart und in Abwesenheit von Säuren und Basen in Wechselwirkung zu treten und dabei oft in erheblicher Weise die Eigenschaften des Proteins zu beeinflussen. Die Wirkung der Neutralsalze kann sich auf isoelektrisches Protein, auf unlösliche und lösliche Proteine (z. B. Lösung der Gelatine, Aussalzung gelöster Proteine) und auf Einwirkungen auf die durch Säuren oder Basen hervorgerufenen Proteinkationen und Anionen erstrecken.

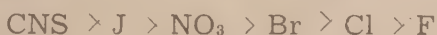
Die im Abschnitt „Isoelektrischer Punkt“ diskutierten Gesetzmäßigkeiten gelten streng genommen nur, wenn im Medium praktisch keine Salze zugegen sind, weshalb man bei Bestimmung des I. P. die Pufferkonzentration zur Festlegung der $[H^+]$ möglichst niedrig z. B. 0,005 n hält. Werden Salze zugesetzt, so kann man beobachten, daß Kationen den I. P. in Richtung höherer, Anionen in Richtung niedrigerer pH-Werte, also in saurer Richtung verschieben. Der Effekt hängt ab von der Wertigkeit und den spezifischen Eigenschaften der Ionen, und bei ein und demselben Elektrolyten von der Jonenstärke (μ). Unter dieser versteht man den Ausdruck

$$\mu = \frac{\sum c \times Z^2}{2}$$

Darin ist $\sum c$ die Summe der molaren Konzentration (c) und Z die Wertigkeit aller Ionen. Bei der Bestimmung des I. P. ist also auf die etwaige Gegenwart von Salzen Rücksicht zu nehmen, wenn die erhaltenen Werte Anspruch auf Zuverlässigkeit erheben wollen.

Bei einer Reihe von Proteinen wirkt sich der Einfluß der Neutralsalze in der Ermöglichung ihrer Löslichkeit aus. Die Globuline sind geradezu dadurch gekennzeichnet, daß sie erst in Gegenwart von Salzen in Lösung zu gehen vermögen. Zur Erklärung der löslichkeitsfördernden Salzwirkung sei daran erinnert, daß die chemisch verschieden konstituierten Seitenäste der Peptidketten teils sauren, teils basischen Charakter tragen, wodurch die Zwitterionennatur der Proteine zustande kommt. Die Zwitterionen vermögen durch gegenseitige elektrostatische Attraktion eine Art von inneren Salzen zu bilden, wodurch je nach dem Ausmaß dieser gegenseitigen

Absättigung die Löslichkeit der Proteine stark herabgesetzt oder gänzlich aufgehoben werden kann. Soll das Protein in Lösung gehen, so muß sich Wasser unter Hydratation an elektroytisch dissoziierbare (oder lyophile) Gruppen anlagern, wodurch die Attraktionskräfte überwunden werden. Neutralsalze haben nun die Fähigkeit, selbst oft schon in schwacher Konzentration die elektrostatische Attraktion der Zwitterionen erheblich zu reduzieren, woraus eine erhöhte Löslichkeit folgt. Und zwar haben sowohl Kationen wie Anionen diese Wirkung, wobei die Wirkung selbst proportional dem Quadrat der Ionenwertigkeit ist. Auch hier erweist sich der Salzeffekt wieder als eine Funktion der vorhin erwähnten Ionenstärke. Bei ein- einwertigen Salzen findet man bei konstantem Kation die Reihe



und bei konstantem Anion die Reihe $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{Cs}$. Da die Anionen und Kationen infolge dieser spezifischen Effekte nicht gleich stark wirken und in unterschiedlicher Weise an das Protein angelagert werden, muß eine einseitige Ladung und damit die Tendenz zur Dispersion und zum Inlösung gehen die Folge sein. Während also die Erhöhung der Löslichkeit eines Proteins unter dem Einfluß von Neutralsalzen auf der Schwächung der Coulombschen Attraktionskräfte zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen beruht, können die Salze in höheren Konzentrationen die Löslichkeit dadurch herabsetzen, daß sie Wasserdipole aufnehmen und gewissermaßen für sich beschlagnehmen. Sie wirken damit auf das gelöste Protein dehydratisierend, sodaß es schließlich sich aus der Lösung unlöslich abscheidet (Aussalzungseffekt). Die quantitativen Beziehungen zwischen Aussalzeffekt, Salzkonzentration und Proteinlöslichkeit wurden hauptsächlich von Cohn studiert. Bezeichnet S die Löslichkeit des Proteins in der Salzlösung, β eine mit pH und Temperatur wechselnde und die amphoteren Eigenschaften ausdrückende Konstante und $K's$ einen charakteristischen Größenwert einer gegebenen Salz-Proteinkombination (Aussalzungskonstante), so gilt

$$\log S = \beta - K's \cdot \mu,$$

wobei μ wieder die Ionenstärke derstellt. Mit Hilfe dieser Aussalzungskonstante lassen sich Proteine charakterisieren und differenzieren. Besonders Phosphatpuffer haben sich für solche Zwecke als sehr geeignet erwiesen, weil sie in großer Aussalzungstärke, definiertem pH und Ionenstärke hergestellt werden können. Car-

boxyhaemoglobin von Mensch und Tier, ferner Carboxymyoglobin und Carboxyhaemoglobin des Pferdes konnten auf diese Weise mit Hilfe der β — und K's — Werte leicht unterschieden werden.

Eine letzte Wirkung der Neutralsalze bezieht sich auf die durch Säuren oder Basen positiv oder negativ aufgeladenen Proteinionen. Hierüber liegen insbesondere von Wo. Pauli, ferner S. P. L. Sörensen und J. Loeb ausgedehnte Untersuchungen vor, die sich verschiedener physikalisch-chemischer Methoden z. B. der viscosimetrischen, der osmotrischen und der Messung von Donnangleichgewichten und Membranpotentialen bedienten. Sämtliche Methoden erbrachten übereinstimmend den Nachweis, daß die Neutralsalzwirkung in einer Zurückdrängung der durch Säure oder Lauge bewirkten Jonisation des Proteins, in einem Absinken seiner freien Ladung beruht, wobei eine Herabsetzung der Aktivität des betreffenden Gegenions und schließlich eine Anlagerung der Neutralsalzionen an das Protein erfolgt. Der Salzeffekt zeigt sich z. B. in einer Herabsetzung von Viscosität, osmotischen Druck, Membranpotential einer durch Säure bis zur maximalen Entwicklung dieser Eigenschaften gebrachten Proteinlösung unter dem Einfluß zugesetzter Neutralsalze. Es ist das Verdienst von Loeb, bewiesen zu haben, daß bei genau festgelegtem pH auf Proteinkationen nur Salzanionen und zwar nach Maßgabe ihrer Wertigkeit (bzw. Jonenstärke), auf Proteinanionen hingegen Salzkationen entsprechend ihrer Wertigkeit wirksam sind. Aus den neueren Arbeiten Wo. Paulis geht jedoch hervor, daß dem unverkennbaren Einfluß der Wertigkeit, wonach z. B. Sulfate auf positive Proteine bedeutend stärker wirken als Chloride, doch ein ausgesprochener Einfluß der spezifischen Joneneigenschaften bei gleicher Wertigkeit festzustellen ist, wofür folgender kurzer Auszug aus einer Tabelle Wo. Pauli's als Illustration dienen mag:

1,58%iges Serumalbumin + 0,2 n HCL, Konzentration der zugesetzten Salze 0,03 n.

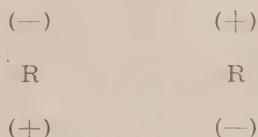
	Viscosität //
ohne Salz	1,641
mit Na Cl	1,262
„ K Br	1,229
„ K J	1,187
• „ C Cl ₃ COO Na	1,157
„ K S C N	1,135

6. Proteinkomplexe.

In der Natur kommen die Proteine fast immer als Symplexe d. h. in Verbindung mit Kristalloiden oder Kolloiden vor. Die Bindung zwischen dem Protein und dem Symplexpartner kann sehr verschiedener Natur sein und teils auf van der Waal'sche Kohäsionskräfte zwischen ungeladenen Gruppen, teils auf Coulomb'sche Attraktionskräfte zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen zurückgeführt werden. Die hauptsächlichsten Arbeiten über Proteinsymplexe stammen von dem polnischen Forscher Stephan von Przylecki und dem holländischen Forscher H. G. Bungenberg de Jong. Letzterer unterscheidet je nach der Zahl der an der Symplexbildung teilnehmenden Ionen folgende Typen:

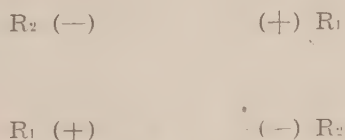
1. Unikomplexe, zwischen Amphionen.
2. Dikomplexe, zwischen Kationen und Anionen.
3. Trikomplexe, zwischen Kationen, Anionen und Amphoionen.

Ein unikomplexes System läßt sich bildlich folgendermaßen veranschaulichen:



Zwei Amphionen sind also durch elektrostatische Attraktionen ihrer negativen und positiven Gruppen wechselweise in Bindung getreten (gestrichelte Linien). Als Beispiel für diesen Typ wären die Globuline an ihrem isoelektrischen Punkt zu nennen.

Ein Beispiel für ein Dikomplex wäre die Vereinigung von 2 kolloiden Ionen nämlich positiv geladene Gelatine R_1 (+) mit negativ geladenem Ca-arabinat R_2 (—), welche sich wie folgt darstellen würde:



Von allgemeinen Eigenschaften der Komplex-Systeme sind zu nennen: Die Ladung der Zwischenschicht zwischen Komplexsystem

und umgebender Gleichgewichtsflüssigkeit wird durch das Verhältnis der das System aufbauenden Komponenten bestimmt. Herrscht ein Komplexpartner vor, so beherrscht dieser die Ladung der Zwischenschicht, während beim Ausgleich beider die Zwischenschicht ungeladen bleibt. In diesem Falle ist der Wassergehalt des Komplexes ein Minimum. Der Wassergehalt (und folglich der Grad der Dehydratation auf Grund der Coulomb'schen Attraktion) ist für die Erscheinungsform des Komplexsystems von großem Einfluß, es kann die Form eines Komplexsoles — Coazervates — Flocken annehmen und in besonderen Fällen sogar die Kristallform aufweisen. Der Zusatz von Neutralsalzen schwächt die elektrostatische Anziehung und verringert infolgedessen die komplexe Bindung, oder bricht eine solche auf. Die Aktivität der Neutralsalze wird auch hier wieder durch die Valenzregel beherrscht. Für Salze mit 1 wertigem Kation und ein-, zwei- und dreiwertigen Anion gilt $(1-1) < (1-2) < (1-3)$, und umgekehrt für mehrwertige Kationen bei einwertigem Anion $(1-1) < (2-1) < (3-1)$.

Infolge der Tatsache, daß die Jonen eines Neutralsalzes sich ungleich anlagern, können Kombinationen von einwertigem Kation mit mehrwertigem Anion negativierend, solche von 1 wertigen Anion mit mehrwertigem Kation positivierend auf die Zwischenschicht wirken.

Zusätze von dehydrierenden Agentien wie Alkohol oder Azeton verstärken die Komplexbildung infolge Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante und der damit verbundenen Verstärkung der Coulomb'schen Kräfte.

Die hier von allgemeinen Gesichtspunkten nur kurz betrachtete Symplexbildung von Proteinen mit anderen kolloiden oder kristalloiden Partnern spielt in den Zellen und Geweben der Organismen, bei der Darstellung von Proteinen, aber auch bei technischen Prozessen, wo Proteine mit anderen Substanzen in einem Medium zusammen auftreten (wie Würze und Bier) eine wichtige Rolle. Nachdem, wie angedeutet wurde, die Symplexbildung größtenteils durch die elektrische Ladung der Partner bedingt ist und diese durch Milieueinflüsse wie pH-Änderung, Salzkonzentration u. a. beeinflußt wird, ist es verständlich, daß bei Milieuveränderungen auch Änderungen im Gefüge von Symplexen beobachtet werden, wie dies z. B. für die Protein-Tanninverbindungen tatsächlich der Fall ist,

7. Zusammenfassung: Theorie der Elektrolytwirkung auf Proteine.

Die bisherigen Betrachtungen haben das Proteinmolekül in seiner Wechselwirkung mit Elektrolyten und zuletzt auch mit anderen Kolloidionen unter verschiedenen Aspekten erscheinen lassen. Dabei wurde im Wesentlichen das Hauptgewicht auf die zu beobachtenden Erscheinungen, also auf die phaenomenologische Seite gelegt und die Theorie nur soweit als nötig berührt. Zur Abrundung und Zusammenfassung des Gebrachten, soll nunmehr noch in gedrängter Kürze auf die Theorie eingegangen werden.

Das schon lange bekannte und zur Grundlage theoretischer Überlegungen gemachte Grundexperiment ist die Erhöhung der Viscosität einer Proteinlösung nach Zusatz von Säure oder Alkali, die Erreichung eines Maximums und die bei weiterem Zusatz von Säure oder Alkali sodann erfolgende Abnahme der Viscosität. Lacqueur und Sackur deuteten dieses Verhalten derart, daß sie den unter dem Einfluß von Säuren oder Alkalien sich bildenden Proteinionen eine starke Hydratation, also Wasserbindung zuschrieben, welche sich in einer Zunahme der inneren Reibung manifestiert. Der Rückgang der Viscosität bei stärkerem Säure- oder Basenzusatz erklärt sich aus dem Massenwirkungsgesetz dadurch, daß die Dissoziation der Proteinionen zurückgedrängt und damit die Hydratation verringert wird. Diese Theorie wurde von Wo. Pauli und seinen Mitarbeitern in zahlreichen Arbeiten weiter ausgebaut und vertieft.

Darnach ist das Proteinmolekül, wenn es in wässriger Lösung vorliegt, hydratisiert, d. h. Wassermoleküle werden als Dipole vom Proteinmolekül teils fest gebunden, teils so beeinflußt, daß sie ihre freie Beweglichkeit weitgehend verlieren, damit als eine „Hülle“ den Umfang des Protein-Teilchens vergrößern und seine Beweglichkeit und andere physikalisch-chemische Eigenschaften desselben beeinflussen. Die Einwirkung von Säuren oder Alkalien auf Proteine besteht nun, wie erwähnt, in einer Protonaufnahme oder Protonabgabe durch das Proteinmolekül, wodurch dieses positiv bzw. negativ aufgeladen wird. Aus den im elektrolytfreien Eiweiß hauptsächlich vorliegenden Zwitterionen werden so Proteinkationen oder Proteinanionen. Pauli bezeichnet die der gesamten gebundenen Säure oder Lauge entsprechende Aufladung als Gesamtladung. Doch diese genügt noch nicht, um ein verläßliches Urteil über den Dissoziationszustand des Proteinions abzugeben, denn dazu gehört auch die Kenntnis, in welcher Weise sich die Gegenionen, z. B. bei HCL

Cl-Jonen, bei NaOH Na-Jonen verhalten, z. B. sich ans Eiweißmolekül anlagern, assoziieren oder als Bestandteile einer das Proteinteilchen umgebenden Jonenhülle die Eigenschaften desselben beeinflussen. Die Versuche zeigten nun und zwar überzeugend auf dem Wege potentiometrischer Jonenaktivitätsmessungen, daß die Gegenionen mit zunehmendem Salzsäurezusatz fortschreitend inaktiviert und vom positiven Proteinion festgehalten werden. Damit aber tritt eine Verminderung der Gesamtladung ein und nach außen macht sich eine geringere Ladung bemerkbar, als sie den aufgenommenen Protonen entspricht. Diese nach außen wirkende Ladung nennt Pauli die freie Ladung. Mit diesem Vorgang ist zugleich eine Abnahme der Hydratation der Proteinteilchen verbunden, die unter Umständen bis zur Unlöslichkeit des Proteins führen kann (Eiweißkoagulation durch starke Säuren). Der Rückgang der freien Ladung kann ebenso erreicht werden, wenn nach Erreichung des Viscositätsmaximums der Proteinlösung Neutralsalze z. B. Natriumchlorid zugesetzt werden. Pauli's Theorie besagt also, daß sich parallel mit der freien Ladung auch die Hydratation der Proteinionen verändert und daß jede Veränderung der Hydratation entsprechende Veränderungen verschiedener anderer Eigenschaften, wie Viskosität, osmotischer Druck, Wanderungsgeschwindigkeit etc. zur Folge habe und zwar treten alle diese Veränderungen beim gleichen pH-Wert jeweils ein. In den letzten Arbeiten gibt Pauli besonders bezüglich des Verlaufes der Viscositätskurve noch einige interessante Erklärungen. Diesen zufolge kann man sich die Zunahme der Viskosität bis zum Maximumwert so vorstellen, daß unter der Wirkung der Protonaufnahme und der damit verbundenen Aufladung intraionische Abstoßungskräfte Assoziate im Eiweißmolekül auflockern und spreiten, sodaß unter Wasserblockierung Aggregate mit größerem Volumen entstehen. Dieses Lockeraggregat wird mit Abnahme der freien Ladung als Folge der Inaktivierung und Anlagerung der Gegenionen — unter entsprechendem Viscositätsabfall — wieder zu einem dichteren Assoziat mehr oder minder zurückgebildet. Da hierbei intramolekular immer ein Rest einsinniger, ionischer Kräfte übrig bleibt, kann der Entladungseffekt niemals bis zum ursprünglichen elektrolytfreien Zustand des Proteins führen, was das Experiment auch bewies.

Im Gegensatz zu der heute vielfach acceptierten und gut fundierten Theorie von Wo. Pauli gründete J. Loeb seine Theorie auf das Donnan-Membrangleichgewicht. Für den osmotischen Druck, ferner für Quellungserscheinungen an unlöslichen Proteinen stößt die An-

nahme der Gültigkeit von Membrangleichgewichten auf keine Schwierigkeiten. Loeb nimmt aber auch für Gelatinelösungen Aggregate von Gelatinemolekülen an, die als Teilchen aufgefaßt werden sollen, deren Quellung und damit auch Viscosität von den Membrangleichgewichten beherrscht wird. Auch Loeb beansprucht für seine Theorie als Stütze, daß die Maxima für osmotischen Druck, Quellung, Viscosität auf den gleichen pH-Wert fallen und ferner noch besonders die Valenzregel.

Die Loeb'sche Theorie stellt lediglich eine andere Deutung der Erscheinungen dar. Die Arbeiten Loeb's über die Membranpotentiale und das Donnan-Gleichgewicht haben in vielen Einzelheiten eine wertvolle Bestätigung des mit ganz anderen Methoden erhaltenen Erscheinungsbildes gebracht.

F. Einteilung der Proteine

Im Gegensatz zu den anderen im Pflanzen- und Tierreich vorkommenden Naturstoffen, wie Zellulose, Stärke, Fette, welche mit wenig abweichenden Eigenschaften und infolgedessen ziemlich unspezifisch im Naturreich vorkommen, findet man bei den Proteinen eine sehr weitgehende Spezifität, die sich oftmals nicht nur auf die einzelne Pflanzen- oder Tierart sondern darüber hinaus auf die einzelnen Organe der betreffenden Art erstreckt. Die Spezifität kann eine so feine sein, daß sie mit rein chemischen Methoden nicht mehr sicher feststellbar ist, wohl aber mit biologischen Methoden auf dem Wege der Immun- bzw. Praecipitinreaktion sicher nachweisbar wird. Wenn wir also von einem Albumin sprechen, so erweist sich zwar das in pflanzlichen Samen vorkommende, ferner das im Ei und im Serum auftretende Albumin nach chemischer und physikalischer Richtung einander ähnlich, durch die biologische Methode läßt sich jedoch einwandfrei ein Unterschied zwischen dem Albumin von Hühnern- und Enteneiern nachweisen. Bei der ungeheuren Variationsmöglichkeit, die sich durch die verschiedene Anordnung der ca. 25 Aminosäuren im Proteinmolekül ergibt, findet die beobachtete feine Differenzierung der Proteine leicht ihre Erklärung.

Die allgemeine Einteilung der Proteine erstreckt sich demgemäß auf die durch chemische und physikalisch-chemische Methoden zu begründenden Unterschiede und umfaßt in empirischer Weise allgemeine Gruppen von Proteinen. Man ist gewohnt, folgende Gruppen zu unterscheiden:

1. Einfache Proteine (Albumine, Globuline, Prolamine, Protamine und Histone)
Gerüstproteine (Kollagen, Keratin, Fibroin etc.)
2. Zusammengesetzte Proteine oder Proteide (Phosphor — Nucleo — Glyco — und Chromoproteide.)

1. Einfache Proteine.

Diese können im allgemeinen einfach dadurch charakterisiert werden, daß sie bei der Hydrolyse mit Säuren oder Fermenten als letzte Bausteine nur Aminosäuren liefern.

a) Albumine.

Sie sind vor allem durch ihre Löslichkeit in salzfreiem Wasser ausgezeichnet, lösen sich aber natürlich auch in verdünnten Säuren, Alkalien und Salzlösungen auf. In Lösung sind sie durch Hitze koagulierbar und zwar am besten bei schwach saurer Reaktion. Infolge der besseren Löslichkeit sind sie schwerer fällbar als die Globuline, z. B. nicht aussalzbar durch NaCl bei Sättigung und neutraler Reaktion, auch nicht durch Sättigung mit MgSO_4 . Dagegen durch Sättigung mit $\text{MgSO}_4 + \text{NaCl}$, oder durch Sättigung mit NaCl oder MgSO_4 bei saurer Reaktion. Halbsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fällt nicht (dagegen Globuline). Totalsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fällt sie aus. Die Albumine enthalten kein Glycocoll, geben sonst alle Eiweiß-Farben- und Fällungsreaktionen.

Einige Albumine, z. B. Eialbumin neuerdings auch Leucosin sind kristallisiert erhalten worden. Sie sind in wässriger Lösung meist bedeutend mehr dispergiert als die Globuline. Ihre Molatgröße liegt in der Nähe von 30 000. Die wichtigsten tierischen Albumine sind das Serum-Ei- und Lactalbumin. Das Eialbumin enthält unter seinen Hydrolysenprodukten ca. 15% Glukosamin, es gehört also eigentlich zu den Glycoproteiden, wird aber infolge seiner Albumineigenschaften hierher gerechnet. Das in Pflanzen weitverbreitet vorkommende Albumin heißt Leucosin, durch NaCl und MgSO_4 ausfällbar; auch in Pilzen, z. B. der Hefe, kommt ein Albumin, genannt Cerevesin vor.

b) Globuline.

Sie sind unlöslich in reinem Wasser, dagegen löslich in Neutralsalzlösungen, aus denen sie durch starkes Verdünnen mit Wasser (aber nicht immer) gefällt werden. Ebenso werden sie beim Dialysieren der salzhaltigen Lösungen gefällt und können damit von den Albuminen getrennt werden. Außerdem sind sie als amphotere Elektrolyte in Säuren und Alkalien löslich. Durch Sättigung mit MgSO_4 , teilweise auch mit NaCl werden sie gefällt, ebenso durch Halbsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Damit lassen sie sich von den Albuminen, die erst bei Totalsättigung mit Ammonsulfat gefällt werden, trennen. Die Globuline werden ebenso wie die Albumine in der Hitze denaturiert und koaguliert. In Lösung sind sie in weit höherem

Maße kolloid als die Albumine, ihr Molatgewicht ist bedeutend größer als das der Albumine. Die wichtigsten tierischen Globuline sind das Serum-(Milch-) und Eiglobulin; das letztere enthält Glukosamin, ferner zahlreiche Organglobuline wie das Kristallin der Linse des Auges, das Thyreoglobulin der Schilddrüse, das Myosin in Froschmuskeln und andere mehr.

Die Pflanzenglobuline:

Die älteren Arbeiten über die Eiweißkörper in Pflanzen stammen von Ritthausen, die neueren Aufklärungen von T. B. Osborne. Osborne hat viele Pflanzen und Pflanzensamen auf die in ihnen enthaltenen Eiweißkörper untersucht und fand, daß sie innerhalb ein und derselben Art konstante Zusammensetzung aufwiesen, daß aber bei verschiedenen Arten kleine Differenzen auftreten, die um so größer werden, je weiter sich die Arten verwandtschaftlich entfernen. Diese chemisch feststellbaren Differenzen lassen sich auch auf biologischem Wege (Immunisierung) nachweisen.

Die Sameneiweißkörper sind durchwegs einfache Proteine, und nach Osborne phosphorfrei. Ihrem Löslichkeitsverhalten nach gehören sie meist zu den Globulinen, unterscheiden sich aber von den tierischen Globulinen durch folgende Reaktionen:

1. Durch das verschiedene Verhalten gegenüber aussalzenden Neutralsalzen.
2. Durch die schwerere Koagulierbarkeit. Zur vollkommenen Hitzekoagulierung ist genügend Azidität notwendig.
3. Teilweise durch ihre Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen, indem zur Lösung oft höhere Salzkonzentrationen erforderlich sind, als bei den tierischen Globulinen.
4. Durch ihr Bindungsvermögen für Säuren und Alkalien, mit denen sie oft kristallisierte Salze, wie z. B. das Edestin bilden.

Das weitverbreitetste pflanzliche Globulin ist das Edestin, ferner Phaseolin (Bohne), Legumin (Hülsenfrüchte), Conglutin, Glycinin usw. Neben diesen in verdünnten Salzlösungen löslichen Globulinen treten noch einige verwandte Proteine in Pflanzensamen auf, die sich durch ihre Löslichkeit in konzentrierten warmen Salzlösungen auszeichnen, z. B. das Avenalin des Hafers, das aus der warmen Lösung auskristallisiert. Ferner gibt es Proteine vom Globulintyp, die weder in Wasser, noch Alkohol, noch Salzlösungen löslich sind, da-

gegen sich in Säuren und ganz besonders in verdünnten Alkalien lösen. Diese Art nennt man nach Osborne Glutenin. Genauer untersucht ist das Glutenin des Weizens, doch kommen auch in der Gerste, im Hafer, Reis und Mais ähnliche Proteine vor. Sie werden aus der alkalischen Lösung bei genauem Neutralisieren mit Essigsäure gefällt, sind aber oft äußerst schwierig rein darzustellen, da sie von anderen Kolloiden z. B. Gummikörpern, hartnäckig begleitet werden.

c) Alkohollösliche Pflanzenproteine (Prolamine)

Die Samen vieler Cerealien enthalten durch ihre Löslichkeit äußerst charakteristische Proteine, die weder sonst im Pflanzenreiche, noch im Tierreiche beobachtet sind. Sie lösen sich leicht in Alkohol von ca. 70% auf und werden aus dieser Lösung durch Verdünnen mit Wasser, oder aber durch reichen Zusatz absoluten Alkohols gefällt. Ferner sind sie in Alkalien und Säuren löslich. Die Salze dieser Proteine mit Säuren werden von Neutralsalzen aus der Lösung gefällt, die mit Basen bereits durch Karbonate. Chemisch sind sie ausgezeichnet durch hohen Gehalt an Prolin und auffallend hohen Gehalt an Glutaminsäure, weshalb sie Osborne Prolamine nannte. Lysin dagegen fehlt meist gänzlich. Ammoniakstickstoff ist reichlich vorhanden.

Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Gliadin des Weizenendosperms, das als eines der überhaupt bestbekannten Proteine gelten kann. Es kommt mit dem Glutenin vor und bildet mit diesem zusammen eine kolloide Adsorptionsverbindung, den Kleber, der für die einzigdastehende Backfähigkeit des Weizenmehls verantwortlich ist. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser beiden Proteine und damit die kolloiden Zustandsänderungen des Klebers werden als die wesentlichen Ursachen der verschiedenen Backfähigkeiten der einzelnen Weizensorten erkannt.

Im Roggen kommt das gleiche Gliadin wie im Weizen vor, dagegen ist es noch nicht gelungen ein analoges Glutenin daraus herzustellen. In der Gerste (Endosperm) kommt neben etwas Leucosin und Edestin und einem Gluteninähnlichen Körper das Prolamin „Hordein“ vor, das von Osborne und Clapp, ferner von Kleinschmidt hydrolysiert wurde. Bei der Keimung soll es in ein anderes Prolamin, das Bynin übergehen, doch konnte Lüers die Identität der beiden durch eine durchgeführte van Slyke-Hydrolyse nachweisen. Im Mais kommt als Prolamin das Zein vor, das sich von den anderen durch seine Löslichkeit in hochprozentigem Alkohol (96%) auszeichnet. In absolutem Alkohol und in Wasser ist es unlöslich.

d) Protamine und Histone.

Diese Gruppe gehört zu den einfachsten aller bekannten Proteine und ist dadurch ausgezeichnet, daß an ihrem Aufbau nur eine relativ geringe Anzahl von Aminosäuren beteiligt sind, weshalb sie sich ganz besonders gut zu experimentellen Studien über die Konstitutionsaufklärung der Proteine eignen. Unter den aufgefundenen Aminosäuren überwiegen die zweibasischen oft ganz bedeutend die Monoaminosäuren, in manchen Proteinen ist z. B. das Arginin bis zu 85% aller Aminosäuren vertreten. Dadurch besitzen die Protamine und Histone einen ausgesprochenen basischen Charakter und bilden mit Säuren Salze. Die Protamine werden vorwiegend im Sperma, besonders der Fische gefunden und nach der Fischart z. B. Salmin, Sturin, Clupein etc. genannt. Mit anderen Eiweißstoffen geben die Protamine bei schwach ammoniakalischer Reaktion Niederschläge. Die Histone unterscheiden sich von den Protaminen dadurch, daß sie einen geringeren Gehalt an Hexonbasen (Arginin-, Lysin, Histidin) enthalten und niemals frei, sondern gebunden an andere Stoffe z. B. Nucleinsäuren vorkommen, z. B. im Nuclein in Zellkernen, in der Thymusdrüse, in unreifen Fischspermatozoen, in Verbindung mit Haematin im Haemoglobin, in welchem der Eiweißpartner, das Globin, ein Histon ist. In Pflanzen sind Protamine und Histone bisher nicht nachgewiesen, weshalb hier auch nicht näher auf sie eingegangen werden soll, ebenso können auch die folgenden Gerüsteiweißkörper, da sie ebenfalls dem tierischen Organismus eigen sind, nur kurz behandelt werden.

e) Gerüstproteine. (Gerüsteiweißstoffe.)

Sie sind Proteine wie die übrigen auch und lassen sich durch Enzyme und Säuren zu im wesentlichen den gleichen Bausteinen hydrolysieren. Sie haben die gleiche prozentige Zusammensetzung, geben die gleichen Farbreaktionen. Sie sind unlöslich in Wasser, Salzlösungen und tierischen Flüssigkeiten; in verdünnten Säuren und Alkalien kaum löslich, mitunter quellbar. Sie sind charakterisiert durch die Fähigkeit zu „altern“. Die Zusammensetzung bleibt dabei die gleiche, die Löslichkeit nimmt mit zunehmendem Alter ab. So werden z. B. Kollagen und Elastin dem Keratin ähnlich, während die Spaltprodukte, Reaktionen und Zusammensetzungen die früheren bleiben. Einige Vertreter wie Glutin (Gelatine), Keratin (Horn), Elastin, Fibroin, (Seidenleim) sind genauer bekannt, ferner gehören hierher: Spongin des Badeschwammes und das Konchialin in Schalen von Muscheln und Schnecken.

Adenin = 6 Aminopurin.

Hypoxanthin = 6 Oxypurin.

Guanin = 2 amino — 6 — oxypurin.

Xanthin = 2,6 dioxypurin.

Pyrimidinderivate sind:

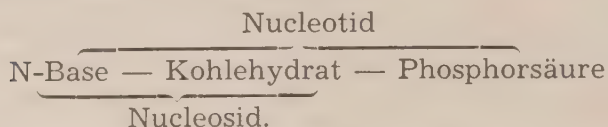
Cytosin = 2 oxy — 6 — aminopyrimidin.

Uracil = 2,6 — dioxypyrimidin.

Thymin = 2,6 dioxy — 5 methylpyrimidin.

Die Bindung der einzelnen Komponenten in den Nucleinsäuren konnte durch stufenweisen enzymatischen Abbau aufgeklärt werden.

Schematisch ist er folgender:

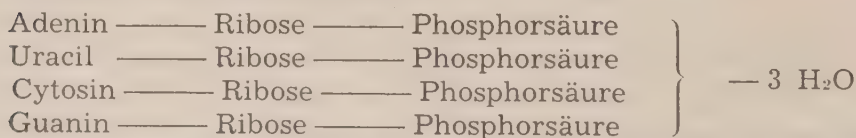


Es ist gelungen eine Reihe von Nucleosiden, also Verbindungen von N-Basen mit Kohlehydrat darzustellen z. B.

Guanosin = Guanin — d — ribosid.

Adenosin = Adenin — d — ribosid.

Von den Nucleotiden, also Verbindungen von Nucleosiden mit Phosphorsäure sind von besonderer Bedeutung die Adenosin — di — und triphosphorsäure geworden, weil sie als prosthetische Gruppen an einer Reihe von Fermenten des Kohlehydratabbaues beteiligt sind. Treten mehrere Nucleotide unter Wasseraustritt zusammen, so entsteht eine Nucleinsäure. Hefenucleinsäure z.B. ist ein Tetranucleotid folgender Zusammensetzung:



Die gegenseitige Bindung erfolgt derart, daß die Ribose des ersten Nucleotids mit der Phosphorsäure des 2., die Ribose des 2. mit der Phosphorsäure des 3. usw. verestert wird.

Die Nucleinsäure nun tritt als ausgesprochene Säure mit Eiweißkörpern zu den Nucleoproteiden zusammen, besonders gerne mit alkalischen z. B. Protaminen oder Histonen, aber auch mit anderen Eiweißstoffen, wenn die Reaktion saurer ist als deren isoelektrischer Punkt. Mit Alkalien lassen sich Nucleinsäuresalze aus den Zellen und Organen extrahieren, mit Essigsäure zusammen mit Eiweißkörpern wieder fällen, wobei die Fällung nach neueren Ansichten als künstliches Nucleoproteid aus anderen Eiweißkomponenten als

den natürlichen bestehend, angesehen wird. Die Kernfärbung der Zellkerne beruht auf ihrem Nucleinsäuregehalt.

c) Glycoproteide.

Diese Proteide liefern bei der Hydrolyse neben Aminosäuren Abkömmlinge von Kohlehydraten z. B. das Chondrosamin und das Glukosamin (Aminoglukose). Hauptsächlich gehören zu dieser Gruppe Schleimstoffe, Mucine, unter denen die Chondroitinschwefelsäure näher untersucht ist. Sie besteht aus Chondrosamin (einem Hexosamin), Glukuronsäure, Essigsäure und aetherartig gebundener Schwefelsäure. Als starke Säuren sind sie ihrerseits wieder mit Proteinen verbunden.

d) Chromoproteide.

Wie der Name sagt, handelt es sich hier um Verbindungen von Eiweißkörpern mit einer Farbstoffkomponente als prosthetische Gruppe. Als Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Haemoglobin zu nennen, das sich aus dem histonartigen Eiweißkörper Globin und dem nicht eiweißartigen Haematin zusammensetzt. Es ist ein biologisch hochbedeutsamer Sauerstoffüberträger im Blut. Verschiedene Haeminderivate bilden zusammen mit Eiweißkörpern die Cytochrome, ferner Enzyme wie die Katalase. Auch das gelbe Atmungsferment kann als ein Chromoproteid aufgefaßt werden, da es aus einem Protein und einer aus Phosphorsäure, Ribose und Lumiflavin (6, 7, 9 — trimethyl — iso — alloxazin) bestehenden prosthetischen Gruppe besteht.

Von den Umwandlungsprodukten der Proteine beanspruchen im Rahmen dieses Buches nur die Albumosen und Peptone Interesse, doch wurde auf diese bereits früher eingegangen.

Literatur zum allgemeinen Teil:

Bei der Abfassung dieses allgemeinen Teiles wurde folgende Literatur benützt, auf welche Interessenten zum Zwecke eingehenderen Studiums im Bedarfsfalle verwiesen seien.

1. S. Edlbacher. Kurz gefaßtes Lehrbuch der physiologischen Chemie. 7. Aufl. W. de Gruyter u. Co., Berlin 1941.
2. Eiweißstoffe von M. Bergmann u. L. Zervas in Handbuch der Pflanzenanalyse von G. Klein. Springer Berlin 1933 IV. Bd. 3. Teil, 2. Hälfte S. 299 bis 362.
3. J. Tillmans u. P. Hirsch. Proteine und sonstige Stickstoffverbindungen im Handbuch der Lebensmittelchemie von Bömer, Juckenack und Tillmans, Springer Berlin 1933 I. Bd. S. 177 bis 254.

4. Konstitutionsaufklärung der Proteine von E. Husemann, Chemikerzeitung 67. 24. 1943.
5. Wo. Pauli u. E. Valko. Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden, Leipzig 1933.
6. Symposium on Proteins. Amsterdam 1938: Daraus besonders
Overhoff, Organic Chemistry of Proteins; G.C. Heringa, Colloid Physics and Biophysics of Proteins; W.A.L. Dekker. On the Physicochemical Characterisation of Proteins and on Protein Complexes; G.Th. Philippi. On the Molecular Weights, Molecular Layers and General Structure of Proteins.

II. Teil.

Die Proteine im Werdegang des Bieres

A. Rohmaterialien

a) Die Gerste.

1. Die Proteinindividuen und ihre Charakterisierung.

Die heute allgemein eingebürgerten Bezeichnungen der in der Gerste vorkommenden Proteine gehen auf die wertvollen Arbeiten des amerikanischen Forschers Th. Osborne (1) zurück, der die vier Proteine: Leucosin, Edestin, Hordein und Glutelin in der Gerste unterschied. Im einzelnen lassen sich diese vier Proteine auf Grund der seit Osborne's Zeiten bis heute an ihnen angestellten Forschungen folgendermaßen näher charakterisieren:

Leucosin ist ein pflanzliches Albumin, das im Pflanzenreich weit verbreitet vorkommt und sich außer in der Gerste auch in anderen Cerealien findet. Wie alle Albumine ist es in reinem Wasser löslich, löst sich aber auch in Salzlösungen, verdünnten Säuren und Alkalien. Bei der Dialyse gegen destilliertes Wasser bleibt das Leucosin in Lösung. Bei schwach saurer Reaktion läßt es sich aus der Lösung durch vollständige oder nahezu vollständige Sättigung mit Ammonsulfat aussalzen. Sein isoelektrischer Punkt wurde von Lüers und Landauer (2) nach fünf verschiedenen Methoden bestimmt und folgendes Ergebnis erhalten.

	Isoel. P. = [H']
1. Optimum der Hitzekoagulat.	$2,6 \times 10^{-5}$
2. Kataphorese	$2,8 \times 10^{-5}$
3. Optim. d. Alkoholfällbarkeit	$2,7 \times 10^{-5}$
4. Minimum der Viscosität	$2,3 \times 10^{-5}$
5. Maximum der Oberflächenspann.	$2,2 \times 10^{-5}$
im Mittel	$2,5 \times 10^{-5}$

Daraus berechnet sich für die relative Azidität des Leucosins $\frac{ka}{kb}$ der Wert $8,6 \times 10^4$. Beim pH des isoelektrischen Punktes (ca. 4,6) wird das Leucosin durch Erhitzen am leichtesten und vollständigsten aus der Lösung auskoaguliert.

Bereits im Jahre 1895 äußerte Osborne über das Leucosin: „Die Diastase steht dem Albumin der Gerste, welches Leucosin genannt wird, sehr nahe und es ist nicht unwahrscheinlich, daß weitere genauere Untersuchungen zeigen werden, was für ein Zusammenhang besteht“. Die Fortschritte der Enzymchemie haben gezeigt, daß die Enzyme aus einem kolloiden Träger von Eiweißnatur, dem Apoferment und der prosthetischen Wirkgruppe, dem Coferment bestehen. In zahlreichen Fällen hat man die chemische Natur des Cofermentes genau aufklären können und in manchen Fällen auch nähere Einblicke in die Art des Trägerproteins erhalten.

In letzter Zeit wurden nun von H. Lundin (3) im Rahmen von Untersuchungen, welche vom Zentrallaboratorium der Stockholmer Brauereien in Zusammenarbeit mit dem Institut für physikalische Chemie der Universität Upsala über die Proteine der Gerste und ihre Veränderung während des Brauprozesses ausgeführt wurden und über welche E. Sandegren (4) berichtete, die Ergebnisse von Untersuchungen über die Amylasen des Malzes veröffentlicht. Lundin stellte durch Extraktion von Gerste und Malz mit verdünnter Kochsalzlösung Proteinextrakte her, deren Fraktionierung wie folgt durchgeführt wurde. 40%ige Sättigung mit Ammonsulfat, Verwerfen des Niederschlages (Edestin), Sättigen der Lösung bis zu 90% mit Ammonsulfat, Lösen des Leucosinniederschlags in Phosphatpuffer von pH 7, Dialyse, Sättigung der dialysierten Lösung bis 70% mit Ammonsulfat, Lösen des Niederschlags in Phosphatpuffer, dialysieren. Wiederholen der Operation, bis bei der Dialyse keine Fällung mehr eintrat.

Das auf diesem Wege erhaltene reine Gerstenalbumin „Leucosin“ erwies sich mit der diastatischen Wirksamkeit verbunden und zwar steigt die letztere mit dem Reinheitsgrad des Leucosins. Gerstenalbumin zeigt nur β — Amylase — Wirksamkeit (Saccharogenamylase), Malzalbumin dagegen α — und β — Amylaseaktivität (Dextrinogen- und Saccharogenamylase). Beide Albumine verhalten sich in der Ultrazentrifuge gleich, insofern sie die Sedimentationskonstante 4,6 S besitzen, was einem Molekulargewicht von $\sim 70\,000$ entspricht.

Lösungen von Gerste- und Malzalbumin lassen sich durch Ultrafiltration konzentrieren und durch Gefriertrocknung (Sublimation von Wasser aus dem Gefriergut im Vacuum) in hochwirksame, haltbare Trockenpräparate überführen. Von K. H. Meyer, E. Fischer und P. Bernfeld (5) in kristallisierter Form gewonnene Pankreasamylase zeigte bei pH 6,9 eine enzymatische Wirksamkeit von gleicher Größenordnung als die reinsten aus Malz erhaltenen Präparate von α — Amylase bei pH = 5:

Pankreasamylase:	α Wirksamk. 263 000 E; β Wirksamk. 26 000 E.
Malzamylase:	α Wirksamk. 241 000 E; β Wirksamk. 96 000 E.

Edestin ist ein pflanzliches Globulin, dessen Vorkommen ebenfalls nicht auf die Gerste beschränkt ist. Wie alle Globuline ist es nicht in reinem Wasser, sondern nur in verdünnten Salzlösungen löslich. Die Brauwassersalze und die löslichen Salze von Gerste und Malz genügen bereits, um einen erheblichen Anteil des Edestins in Lösung zu bringen. Aus einer solchen Lösung läßt es sich durch weitgehendes Wegdialysieren der Salze ausfällen, während das Leucosin in Lösung verbleibt. Von Ammonsulfat wird es bereits bei 40—50%iger Sättigung der Lösung ausgesalzen. Aus der wässerigen Salzlösung kann das Edestin beim pH von Maische und Würze nur unvollkommen herauskoaguliert werden. Nach Holwerda (6) liegt der isoelektrische Punkt des Edestins nicht wie bisher angenommen bei pH 5—6, sondern bei pH 7. In Lösungen saurer als pH 5,2 wird es in zunehmenden Maße denaturiert. Durch seine Eigenschaften ist es in erster Linie das Gerstenprotein, welches zu Trübungen im Bier Veranlassung geben kann.

Vor einiger Zeit hatte H. Lundin (7) an der Bezeichnung „Edestin“ für das Gerstenprotein Kritik geübt, denn reines Edestin, aus Hanfsamen hergestellt, hatte nach Svedberg (8) auf Grund von Messungen in der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von $212\,000 \pm 10\,000$, während nach Lundin die Gersteneiweißkörper nur Molekulargewichte von 35 000 und 70 000 besaßen. Die Arbeiten wurden von Quensel und Svedberg (9), ferner von Säverborn, Daniellsson und Svedberg (10) fortgesetzt, worüber Sandegren (4) berichtet. Da es sich in den ersten orientierenden Versuchen bereits zeigte, daß das Gerstenglobulin nicht einheitlich, sondern aus mehreren Komponenten zusammengesetzt war, wurde von Quensel nach folgendem Schema eine Fraktionierung des Globulinanteils der Gerste vorgenommen.

1. Gerstenmehl

2. Extraktion mit Standardpuffer pH. 7.0

3. Fällung mit Am. S. Sättigung 15/100.

Fällung	Lösung	
4. Lösen in Stand. Puffer	8. Fällung mit Am. S. 40/100	
5. Fälln mit Am. S. 7,5/100		
	Fällung	Lösung
Fällung	Lösung	
6. Lösen in Stand. Puff.	9. Fällung mit Am. S. 70/100	
7. Frakt. enth. β	Fällung	Lösung
	10. Lösen in Stand. Puff.	
	11. Fällung d. Globul. d. Dialyse	
	12. Lös. d. Fäll. in Stand. Puff.	
	13. Fraktionieren in d. Zentrif.	

14. Frakt. enth. α

15. Frakt. enth. γ u. δ

Die an γ reiche Fraktion enthält auch die δ — Komponente, welche sich durch weitere Fällung mit Ammonsulfat (Am. S.) von γ abtrennen läßt, doch stellt sie nur einen geringen Teil der Fraktion dar, und wurde deshalb nicht so gründlich, wie die anderen Fraktionen untersucht.

Einige Daten über die verschiedenen Globulinfraktionen enthält folgende Tabelle:

Komponente	Sedimentat. Konstante	Molekular- Gewicht	Isoelektr. Punkt.
α	2,49	26 000	5,00
β	6,21	ca. 100 000	4,90
γ	8,30	166 000	5,70
δ	12,00	ca. 300 000	—

Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, daß die „Edestin“ bezeichnete Proteinfraction der Gerste in keiner Weise homogen ist, sondern Proteine vom Molekulargewicht 26 000 bis 300 000 umfaßt. Da echtes Edestin ein Molekulargewicht von über 200 000 besitzt, so liegen in der Gerste in den Komponenten α und β zweifellos Proteine vor, die man zweckmäßiger mit der Bezeichnung Globulosen, statt Globuline belegt. Nach ihren Löslichkeitseigenschaften kommt ihnen allerdings Globulincharakter zu.

Das **Hordein** ist ein zur Gattung der Prolamine gehörender Eiweißkörper, der durch seine charakteristische Löslichkeit in etwa 70%igem Alkohol ausgezeichnet ist, die er z. B. mit dem Gliadin des Weizens und mit dem Zein des Maises teilt. Diese alkohollöslichen Prolamine sind in ihrem Vorkommen ausschließlich auf die Cerealiensamen beschränkt. Sie sind unlöslich in Wasser und Salzlösungen, dagegen löslich in Säuren und Alkalien, mit denen sie Proteinsalze bilden. Aus solchen Lösungen lassen sie sich durch Neutralsalze aussalzen. Aus ihren Lösungen in 70%igem Alkohol werden sie sowohl durch starken Alkohol, wie auch durch Verdünnen mit Wasser in flockig-klebrigen Massen ausgefällt. Chemisch sind sie durch hohen Gehalt an Prolin und auffallend hohen Gehalt an Glutaminsäure ausgezeichnet, weshalb sie Osborne Prolamine nannte. Lysin fehlt fast gänzlich, dagegen ist Ammoniakstickstoff (in Säureamidbindung) reichlich vorhanden. Quensel und Säverborn (Sandegren (4)) fanden für das Molekulargewicht des Hordeins 27 000, was mit dem Mol.-Gew. des Weizengliadins von 26 000 nahe übereinstimmt.

Das **Glutelin** ist ein sowohl in Wasser, wie in Salzlösungen und in Alkohol unlöslicher Eiweißkörper, welcher erst in verdünnten Alkalien in Lösung geht. Dieses Protein kommt in relativ größter Menge in der Gerste vor und hat seinen Sitz hauptsächlich in der Aleuronschicht, mit der es ziemlich unverändert in die Treber eingeht.

Anderson (11) und Rose und Anderson (12) hegten in neuerer Zeit Zweifel an der Individualität der beiden Proteine Hordein und Glutelin und halten sie vielmehr für einen Komplex, der lediglich durch entsprechende Lösungsmittel fraktioniert werden kann. Diese Kritik hat natürlich eine gewisse Berechtigung, insofern als Eiweißkörper untereinander oder auch mit anderen organischen Verbindungen z. B. mit Kohlehydraten oder Phosphatiden sogenannte Symplexe (siehe S. 63) bilden können und im Protoplasma bestimmt auch bilden, da auf diesem Wege die komplizierten Stoffwechsel-

und Permeabilitätsverhältnisse erst erklärlich werden. Nachdem aber gerade das Hordein und das Glutenin durch ihre Löslichkeit sehr gut charakterisiert sind und auch ihre analytische Bestimmung zuverlässig und reproduzierbar durchgeführt werden kann, erscheint es zweckmäßig und vertretbar, aus teleologischen Gründen an den Bezeichnungen Glutelin und Hordein festzuhalten und sie wie zwei Individuen zu betrachten.

Schließlich fand Osborne in Gerste noch sehr geringe Mengen von Proteosen, also Eiweißabbauprodukten, welche im Laufe der Reifung und Lagerung anscheinend der Kondensation zu hochmolekularen Proteinen entgangen sind.

Sehr geringe Mengen Ammoniakstickstoff sind entgegen einer Vermutung Moufangs (13) nach den Feststellungen von Leberle und Lüers (14) belanglos und ohne Bedeutung.

Die analytische Bestimmung der einzelnen Proteinindividuen der Gerste ergibt sich aus ihren Löslichkeitseigenschaften. Osborne hat die geeigneten Bestimmungsmethoden bereits in seinen Arbeiten (1) entwickelt und zur quantitativen Ermittlung der einzelnen Proteine in der Gerste angewandt. Über den weiteren Ausbau und die heutige Art der Anwendung dieser Methoden wird weiter unten berichtet werden.

Zuvor aber erfordert ein Gebot der Dankbarkeit und Hochachtung, auf das von unermüdlichen Fleiß und größter Gewissenhaftigkeit zeugende Lebenswerk des dänischen Forschers H. Schjerning (15) einzugehen. Die von ihm entwickelten Methoden zur Differenzierung der Stickstoffverbindungen der Gerste und ihrer Veränderungen im Mälzungs- und Brauprozeß haben zum ersten Mal einen tieferen Einblick in die proteolytischen Ab- und Aufbauprozesse im Werdegang des Bieres vermittelt. Schjernings Nomenklatur hat lange Zeit die Brauereiliteratur beherrscht, sodaß es aus historischen Gründen angebracht ist, kurz auf das Wesentliche seiner analytischen Methodik einzugehen. Nach eingehenden Vorarbeiten entwickelte Schjerning eine Stickstoffdifferenzierungsmethode, welche auf der Löslichkeit bzw. Unlöslichkeit einzelner Stickstoffgruppen in verschiedenen Salzlösungen beruht. Als solche fanden Verwendung, Zinnchlorid, Mercurichlorid, Ferriazetat, Uranylazetat, Magnesiumsulfat. Ferner wurde der lösliche, der Ammoniak- und der Gesamtstickstoff der Gersten bestimmt. Wenn man sich bei der Fällung immer an genau festgelegte Konzentrationsbedingungen hält, so stellen die in die Fällung jeweils eingehenden Stickstoffverbindungen Gruppen dar, die zwar nicht durchwegs als

chemische Individuen betrachtet werden können, immerhin aber in physikalisch-chemischer Beziehung eine gewisse Zusammengehörigkeit zeigen. Schjerning hat nach den Erfahrungen der Eiweißchemie hinsichtlich der Fällbarkeit der einzelnen Proteintypen die durch die einzelnen Bestimmungen ermittelten Stickstoffverbindungen mit folgenden Namen belegt, denen zum Vergleich die Osborneschen Bezeichnungen beigelegt sind:

Fällung mit:		enthält Eiweißstoffe:	
Zinnchlorid	= a	Albumin I	(Leucosin)
Mercurichlorid	= b	Albumin I	(Leucosin)
		Albumin II	(Edestin)
Ferriazetat	= c	Denuclein	
		Albumin I	(Leucosin)
		Albumin II	(Edestin)
Uranylazetat	= d	Denuclein	
		Albumin I	(Leucosin)
		Albumin II	(Edestin)
		Proteosen	(Albumosen)
		Peptone	(wirkliche Peptone)
Magnesiumsulfat	= e	Albumin I	(Leucosin)
		Albumin II	(Edestin)
		Proteosen	(Albumosen)

Unlöslicher N = Q

Löslicher N = V

Ammoniak-N = g

Durch Kombination der einzelnen Bestimmungen sind wie folgt die Proteingruppen zu errechnen:

Stickstoff in Form von

Q = unlösliche Verbindungen,

N = lösliche Verbindungen,

a = Albumin I,

b — [a + (c — e)] = Albumin II.

c — e = Denuclein,

c — b = Proteose,

d — e = Pepton,

g = Ammoniak,

N — (d + g) = Amin-Amid.

Denuclein + Proteose + Pepton gibt die Menge der peptischen, Ammoniak + Amin-Amid die Menge der typischen Abbauprodukte an.

Der Eiweißabbau oder -aufbau vollzieht sich dann nach folgendem Schema:

Abbau

Unlöslicher N Albumin II Albumin I peptische trypt. Spaltprodukte

Aufbau

Kritische Untersuchungen von Windisch, Dietrich und Mehltz (16), von Myrbäck (17) u. Bishop (18) erbrachten jedoch den Nachweis, daß die von Schjerning mit Hilfe seiner komplizierten Fällungsmethoden differenzierten Proteinfraktionen keine einheitlich definierten Eiweißkörper sind und die Werte sich außerdem nicht genügend zuverlässig reproduzieren lassen, ganz abgesehen, daß der Arbeitsaufwand, den ein Analysengang nach Schjerning erfordert ein außerordentlich großer ist. Aus diesen Gründen ist man von der Arbeitsweise Schjernings abgekommen und verfährt heute nach wesentlich einfacheren Methoden, doch wird Schjernings Werk auch für die Zukunft jedem, der sich eingehender mit dem Eiweißproblem beschäftigt, wegen der Großartigkeit der Anlage Achtung und Bewunderung abnötigen.

Heute differenziert man die Proteine von Gerste und Malz fast ausschließlich nach der von Bishop (18) entwickelten Methode, welche sich im Prinzip auf die bereits von Osborne entwickelten Verfahren stützt, sich von diesen jedoch dadurch unterscheidet, daß man auf die Ermittlung der Globuline („Edestin“) verzichtet, da diese, wie Osborne selbst schon bemerkte, Schwierigkeiten beim Extrahieren und Reinigen verursachen. Durch Extraktion mit 5%iger Kaliumsulfatlösung erhält man das Albumin (Leucosin), die Globuline und gegebenen Falles lösliche Eiweißabbauprodukte wie Albumosen und Peptone z. B. im Falle des Malzes. Man faßt diese Gruppe unter der Bezeichnung „salzlöslicher Stickstoff“ zusammen. Der Hordeinanteil läßt sich durch die charakteristische Alkohollöslichkeit bestimmen, was von Bishop (18) analytisch ausgenützt wurde. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß im Alkohol auch Phosphatide in Lösung geben, welche sich nach F. Kieferle (19) mit Hilfe von Stutzers Reagens vom Hordein abscheiden lassen. Die Methode ist von Lüers und Geiger (20) ausführlich beschrieben, welche sie auf zahlreiche Malze zur Anwendung brachten. Das Glutelin ergibt sich als unlösliches Protein aus der Differenz von Gesamt N minus der Summe von salzlöslichem und Hordein N.

Als Beispiel der Zusammensetzung des Gesamtgerstenproteins seien folgende von Osborne stammenden Werte gegeben.

Protein	% des Ges.- Proteins	N.-Gehalt %	löslich in
Albumin	4	16,5	Wasser
Globulin	31	18,1	Salzlösung
Glutelin	29	16,2	Alkali
Hordein	36	19,2	Alkohol

2. Verteilung der Proteine im Korn, Quantitative Verhältnisse.

Das Gesamteiweiß der Gerste ist auf die einzelnen Kornpartien verschieden verteilt. Am meisten findet sich in der Aleuronschicht und zwar in unlöslicher, in die Trebern wandernder Form. Im Mehlkörper ist das Eiweiß teils als Reserveeiweiß an der Peripherie des Endosperms in der Nähe der Aleuronzellen abgelagert, teils erfüllt es als histologisches Eiweiß die Endospermzellen und verkittet dort die Stärkekörner miteinander. Eiweißärmere und eiweißreichere Gersten unterscheiden sich vor allem durch die Menge des Reserveeiweißes, wie man durch Färbemethoden an Gerstendünnschnitten nachweisen kann (Grüss 21). Aber auch Keimanlage und sogar die Spelzen enthalten Proteine (siehe unten).

Trotz der morphologisch verschiedenartigen Verteilung des Stickstoffs auf einzelne Organe und Gewebe des Gerstenkornes, ist wohl der Gesamt-Stickstoff gleichmäßig, der dauernd lösliche und koagulierbare Stickstoff aber ungleichmäßig auf die Keimlingshälfte und die Spitzenhälfte des Kornes verteilt, wie folgende Zahlen von W. Windisch und P. Kolbach (22) zeigen:

	ganzes Korn	Keimlings- hälfte	Spitzen- hälfte
Gesamt-N in % des Wertes			
für das ganze Korn	100	100,5	99,2
dauernd lösl. N in % des Wertes			
für das ganze Korn	100	117,1	76,0
koagul. N in % des Wertes			
für das ganze Korn	100	117,0	76,3

Bei Untersuchungen über den Stickstoffgehalt einzelner Gerstenkörner fand N. Nielsen (23) beträchtliche Unterschiede zwischen den Körnern derselben Ähre. Zwischen dem stickstoffärmsten

und dem stickstoffreichsten Korn betrug der Unterschied wenigstens 16%, in der Regel 20 bis 40%, konnte aber sogar auf 85% ansteigen. Bei Körnern verschiedener Ähren ist der Unterschied noch größer und beträgt wenigstens 31%, höchstens 131%. Meist wurden die Körner nach der Ährenspitze zu stickstoffreicher, jedoch fanden sich vereinzelt die N-reichsten Körner an der Ährenbasis. Im Gegensatz zum Stickstoff war der Trockensubstanzgehalt der einzelnen Körner sehr konstant.

Von Interesse ist schließlich noch die Frage, wie sich bei Änderung des Gesamt-Eiweißgehaltes der Gerste die oben aufgeführten vier Proteinindividuen prozentual verhalten. Zur Beantwortung dieser Frage liegen aus neuerer Zeit eingehende Untersuchungen von Bishop (24), Hofman-Bang (25) und Fink und Kunisch (26) vor. Es zeigt sich als wichtigstes Ergebnis, daß die *Zusammensetzung* des Gesamtstickstoffs der Gerste in direkter Beziehung zur *Höhe* des Gesamtstickstoffs steht. Es ist jedoch nicht so, wie man vielleicht erwarten könnte, nämlich daß alle 4 Proteintypen mit steigendem Gesamtstickstoff prozentual gleichmäßig zunehmen, sondern mit steigendem Gesamtstickstoff nimmt zwar der salzlösliche Stickstoff — Leucosin + Edestin — absolut zu, aber weniger stark als der Gesamtstickstoff, sodaß er prozentual absinkt. Der Hordeinstickstoff dagegen steigt stärker an als der Gesamt-N, infolgedessen nimmt er prozentual zu. Nur der Glutelinstickstoff allein steigt gleichförmig mit dem Gesamt-N, sodaß sein prozentualer Anteil am Gesamt-N unverändert bleibt. Der Glutelinstickstoff zeigt bei den untersuchten Sorten deutscher Braugersten eine bemerkenswerte Konstanz, er ist also nicht zur Unterscheidung von Sorten geeignet, dagegen liegen wohl Unterschiede im salzlöslichen N und im Hordein vor. So fiel bei den Studien von Fink und Kunisch die bekannte Heines-Hanna-Gerste durch ihren höheren salzlöslichen und niedrigeren Hordeinstickstoff in allen untersuchten Jahrgängen auf.

Die Tatsache, daß beim Ansteigen des Gesamtstickstoffs vor allem der Hordeinanteil wächst, findet auch eine Bestätigung in Untersuchungen von Piratzky und Wiecha (27) über den Zusammenhang von Korngröße und Eiweißgehalt. Es zeigte sich, daß vom Mehr des Gesamt-Stickstoffs der Sorte I rund $\frac{2}{3}$ allein auf das Hordein entfallen.

Das in den Spelzen enthaltene Protein wurde bereits von Moufang (28) in unreinem Zustand isoliert und als Testinsäure bezeichnet. Von Lüers und Hüttinger (29) wurde es durch Extraktion der Spelzen

mit 0,5%iger Kalilauge und fraktionierte Fällung mit Essigsäure bei pH 5,4 bis 4,1 rein dargestellt. Nach Hydrolyse mit Salzsäure wurden die Aminosäuren durch ein kombiniertes Verfahren nach H. D. Dakin, Damodaran, D. D. van Slyke und Kossel quantitativ bestimmt. Das Spelzenprotein zeichnet sich durch hohen Gehalt an Ammoniak, Prolin, Cystin, Asparaginsäure, Histidin und Arginin aus. Mit anderen pflanzlichen Proteinen und mit verschiedenen eiweißartigen Ausscheidungen im Werdegang des Bieres besitzt es keine Ähnlichkeit, verhältnismäßig am meisten gleicht das Spelzenprotein dem Glutelin der Gerste, mit dem es auch Alkalilöslichkeit und Säurefällbarkeit gemeinsam hat. Trotzdem muß das Spelzenprotein als ein spezifisches Eiweißindividuum betrachtet werden.

3. Proteingehalt und Eigenschaften des Gerstenkorns.

Früher hat man gerne die Glasigkeit des Mehlkörpers mit Eiweißreichtum in Zusammenhang gebracht, was jedoch nur bedingt zutrifft. Bei günstigen klimatischen Verhältnissen können auch eiweißreiche Gersten sehr wohl mehlig Beschaffenheit aufweisen, bei ungünstigen jedoch neigen proteinreiche Gersten zur Glasigkeit. Bei ein- und derselben Gerste (Egelfinger Hado) fand Erich (30) mehlig Körner eiweißärmer als glasige, wie folgende Zahlen zeigen:

mehlig	9,46% Protein i. d. Tr. S.
halbglasig	10,65% " "
ganzglasig	12,32% " "
Gesamtgerste	10,52% " "

Nach Zila, Trkan und Skvor (31) bestehen zwischen der Korngröße (auf Sieben mit $\frac{1}{10}$ mm Schlitzweiten - Unterschied sortiert) und den Kornbestandteilen regelmäßige Beziehungen. Auf 100 g Gerste berechnet, ist der Gehalt an Wasser, Gesamt N, löslichem und koagulierbarem N bei den einzelnen Siebanteilen der gleiche. Auf 1000 Körner bezogen ergeben sich mit sinkender Korngröße fallende Werte. Das Verhältnis von koagulierbarem und löslichem N zum Gesamt-N ist nach beiden Berechnungsarten das gleiche. Das Verhältnis Gesamteiweiß zu Stärke ist bei allen Siebfraktionen das gleiche, woraus hervorgeht, daß in das Gerstenkorn, ob groß oder klein, Eiweiß und Stärke in stets gleichem Verhältnis abgelagert werden und die löslichen Eiweißformen an das Gesamteiweiß eben-

falls durch ein festes Verhältniß gebunden sind. Von besonderer praktischer Bedeutung ist die Beeinflussung der Extraktausbeute durch die Zusammensetzung der Gerste. Hierüber geben vor allem die Arbeiten von Bauer (32) und Haase (33) Aufschluß. Haase fand für die Relation Eiweißgehalt: Extraktausbeute im Malz folgendes:

Eiweiß in der Gerste	9—10	10—11	11—12	12—13
Extrakt im Malz	79—78	77,5—77,0	76,5—74	74—70

Das heißt also, daß mit zunehmendem Eiweißgehalt die Extraktausbeute im Malz absinkt. Wie aber mit vollem Recht O. Neumann (34) bestont, sind die für die Zeiten, in welchen Haase sein Gesetz aufstellte (1903—1906), geltenden Beziehungen heute völlig überholt, denn durch fortgesetzte Veredlung und Verbesserung der Braugersten verfügen wir heute über Sorten, die bei 10% Eiweiß und sonst guter Beurteilung 80 bis 80,5% Extrakt im hellen Malz liefern.

Auch darf nicht übersehen werden, daß nicht nur die Menge, sondern auch die Qualität des Eiweißes von Bedeutung ist, worauf besonders Cluß (35) und Schmidt (36) hinwiesen. Nichtsdestotrotz aber bleibt der Grundgedanke des Haaseschen Gesetzes bestehen, er hat vielmehr insofern noch eine Erweiterung erfahren, als Bishop (37) die Extraktausbeute mit dem Stickstoffgehalt und dem 1000 Korngewicht in eine feste Relation brachte. Für englische Verhältnisse lautet die Bishop'sche Formel:

Extraktausbeute = $110,1 - 11,2 \times \text{Stickstoff} + 0,18 \times 1000 \text{ Korngewicht}$. Die erste Zahl 110,1 ist eine sortenbedingte Konstante und schwankt für eine große Anzahl von Sorten zwischen 110 und 98. Sie ist unabhängig von Boden- und Witterungsverhältnissen. Für deutsche Verhältnisse (mit anderen Maßzahlen und Extraktbestimmungsmethoden) änderte Kolbach (38) die Bishop'sche Formel folgendermaßen ab:

$$E = 88,1 - 9,0 \cdot N + 0,14 \cdot G.$$

Novotny und Karabec (39) fanden für böhmische Malze die Konstante 83,6 am besten stimmend. Neumann (loc. cit. 34) weist in Kritik dieser Extraktformel darauf hin, daß mit zunehmenden 1000 Korngewicht bis 41 g (Tr. S.) der Extrakt proportional zunimmt, über 41 dagegen nicht mehr, was im Gerstenbonitierungssystem insofern berücksichtigt wird, als Gersten mit einem 1000

Korngewicht über 41 nicht mehr höher bewertet werden. Auch Bishop hat ein Überschreiten des 1000 Korngewichtes über 42 in seiner Formel nicht mehr berücksichtigt. Ohne Zweifel aber ist mit der Bishop'schen Formel zum erstenmal eine Relation zwischen Extraktgehalt, Eiweißgehalt und 1000 Korngewicht gefunden, welche die Eiweißfrage nach der quantitativen Seite löst und für Züchtungs- und Vererbungsforschungen an Gerstensorten von Bedeutung ist, indem sie verschiedene Merkmale einer Sorte in einem Extraktfaktor zusammenfaßt.

Ein weiteres Gesetz stellte schließlich Bishop (40) für die Vorhersage des Extraktgehaltes aus dem Stickstoffgehalt (N) und dem Gehalt an unlöslichen Kohlehydraten (J) in der Gerstentrockensubstanz auf. Es lautet für Prozente Extrakt in der Malztrockensubstanz:

$$E = 102,7 - 6,90 \times N - 2,12 \times J$$

Durch dieses an vielen Gersten geprüfte Gesetz wies Bishop die Unvollständigkeit der Haaseschen Hypothese nach, wonach das Eiweiß einfach eine bestimmte Menge Kohlehydrate ersetzt und so den Extraktgehalt um denselben Betrag verringert. In Wirklichkeit läßt sich nur die Hälfte des beobachteten Einflusses auf diese Weise erklären, während die andere Hälfte auf eine Einschließung von Kohlehydraten durch Eiweiß zurückzuführen ist, die verschwindet, wenn Feinmehl verarbeitet wird.

4. Proteingehalt und Sorteneigenschaften; Boden, äußere Faktoren.

In jüngster Zeit wurden von verschiedenen Seiten Untersuchungen über den Zusammenhang von Gerstensorte und nachweisbarer chemischer Zusammensetzung unternommen, wobei auch der Proteingehalt Berücksichtigung fand. Thunnäus und Schröderheim (41) fanden an schwedischen Braugersten, daß das Verhältnis zwischen löslichem Stickstoff (in der Kongreßfeinmehlwürze) und dem Gesamtstickstoff des Malzes eine für jede Sorte charakteristische Zahl ist, wenn diese auch mit Jahrgang und Gesamt N des Malzes schwankt. Als Mittel aus 9 Versuchen von 5 Jahrgängen hatte dieses Verhältnis für die untersuchten Gersten folgende Werte: Gold 37,16%; Binder 44,14%; Opal 41,67%.

Auch die Leichtigkeit, mit der sich das Eiweiß während des Mälzens löst, ist eine charakteristische Sorteneigenschaft. Bindergerste zeigt sehr starke Eiweißlösung, Goldgerste sehr schwache. Die Zunahme des löslichen Stickstoffs im Laufe der Keimung erfolgt für die einzelnen Sorten nach sehr verschiedenen Kurven. Wollte man Bindergerste zu so schwacher Eiweißlösung, wie sie normalerweise Goldgerste zeigt, bringen, so würde man ein völlig unterlöstes, unbrauchbares Malz erhalten. Andererseits ist es nicht möglich, die Eiweißlösung der Goldgerste auf das hohe Niveau der Bindergerste zu bringen, selbst wenn man die Keimung sehr lange ausdehnte und wie lange der Blattkeim auch wachsen mag.

Nach Fink und Kunisch (26) unterscheidet sich Heines Hanna von Isaria, Hado u. a. durchwegs durch höheren Gehalt an salzlöslichem und wasserlöslichem Stickstoff, während ihr Hordeingehalt etwas niedriger liegt als bei anderen Sorten. Dies wird noch durch den stets niedriger liegenden Gesamtstickstoff von Heines Hanna im Vergleich mit anderen Sorten verstärkt. Das Verhältnis salzlöslicher N : Hordein N zeigt also bei Hanna auch bei gleich großem Gesamtstickstoff stets den höchsten Wert von allen untersuchten Sorten.

Nach Untersuchungen von Säverborn (berichtet von Sandegren (4)) scheinen die verschiedenen Globulinfractionen (siehe Edestin a1) besonders hinsichtlich der α - und γ -Komponente mit dem Jahrgang zu variieren. In Keniagerste der Jahre 1938 und 1939 dominierte die α -Komponente, während 1940 und 1941 die γ -Komponente vorherrschte oder der α -Komponente gleichkam. Gersten der Jahre 38 und 39 zeigten auch einen höheren Prozentgehalt an löslichem Stickstoff als die Gersten von 40 und 41. Im Gegensatz zu den α - und γ -Komponenten, war die β -Komponente in all den Jahren ziemlich konstant. Die verschiedenen Globulinkomponenten sind übrigens auch in verschiedenen Kornpartien lokalisiert z. B. die γ -Komponente im Embryo, α - und β -Komponente höchstwahrscheinlich in der Aleuronschicht.

Bei der Bedeutung des Eiweißgehaltes der Gersten in quantitativer und qualitativer Hinsicht, ist die Beeinflußbarkeit des Stickstoffgehaltes der Gersten von besonderem Interesse. Russel und Bishop (42) stellten in einer zusammenfassenden Betrachtung fest, daß der Stickstoffgehalt der Gerste eine Zunahme erfährt: 1. Durch Steigerung des der Pflanze aufnehmbaren Stickstoffvorrates über ein gewisses Maß hinaus. 2. Durch Anwendung später Stickstoffzufuhr.

3. Durch Böden, die reich an organischer Substanz sind. 4. Durch trockenes Wetter besonders im April und Mai. 5. Durch späte Aussaat. 6. Durch späte Saatzpflege und weites Drillen. 7. Durch Aussaat stickstoffreicher Sorten. Dagegen hat eine Abnahme des Stickstoffgehaltes zur Folge. 1. Nasses Wetter besonders im April und Mai. 2. Frühe Aussaat. 3. Anbau von Gersten nach vorangegangener Brache. 4. Allgemein ein jeder Faktor, der eine gute Kornausbildung und Entwicklung der Pflanze begünstigt. 5. Wenn der Stickstoffgehalt schon nieder ist, kann er durch richtige Düngung mit Kali und Phosphor und mitunter auch etwas Stickstoff weiter herabgedrückt werden. Ist er dagegen schon hoch (über 1,6%), so erniedrigt Zusatzdüngung im allgemeinen den Wert nicht. 6. Sorten, die normalerweise einen niedrigen N-Gehalt besitzen.

Nach Weinmann (43) erhöht Stickstoffdüngung bei ausgesprochenen Kalimangel den Eiweißgehalt der Gerste stark, bei kleinen Kaligaben nicht wesentlich, bei hohen Kaligaben setzt er ihn sogar herab.

Bemerkenswerte Ergebnisse über den Einfluß von Phosphorsäuredüngung liegen von Krügel, Dreyspring und Kurth (44) vor, die folgende Tabelle bringt:

	P ₂ O ₅ -Düngung in kg/ha				
	0	30	60	90	150
Durchschn.					
1 000 Korngew.	39,2	41,1	41,4	42,5	42,4
Durchschn.					
hl-Gewicht	68,4	69,4	69,8	69,5	70,3
Durchschn.					
Proteingehalt	13,32	12,37	11,68	11,34	10,88
Durchschn.					
Stärkegehalt	58,0	59,0	59,6	60,3	60,8
Durchschn.					
Extraktgehalt	71,9	73,7	74,6	75,5	76,3

Mit steigender Phosphorsäuregabe wächst also 1000 Korn- und Hektolitergewicht, Stärke- und Extraktgehalt, während der Eiweißgehalt abnimmt, im ganzen gesehen wird somit eine Erhöhung des Brauwertes der Gerste erzielt.

Bezüglich des Einflusses des Bodens liegen folgende von Russel und Bishop (42) stammende Beobachtungen vor. Lehmiger Mergel, der die größten Erträge liefert, brachte Gersten mit dem niedrigsten N-Gehalt, Sandboden die kleinsten Erträge mit höchstem Stickstoffgehalt. Diese umgekehrte Regel zwischen Ertrag und N-Gehalt stimmt dann nicht, wenn größere Stickstoffvorräte im Boden vorhanden sind, so fällt Moorboden infolge seines Stickstoffreichtums aus der Regel heraus. Jeder Boden erzeugt Gersten mit ganz bestimmtem Charakter.

Ordnet man die Gersten nach ihren Werteigenschaften (Geldwert) und die Böden, auf denen sie gewachsen, so ergibt sich die Reihenfolge: Lehm, Mergel, schwerer Lehm, Sand, Moor, eine Reihe nach welcher die Böden den Wert und nahezu in gleicher Weise den Korn-Stickstoffgehalt beeinflussen.

5. Proteine bei der Reifung und Keimreife der Gerste.

Mit dem Aufbau der Proteine im reifenden Korn beschäftigte sich in ausführlicher Weise H. Schjerning (15). Trotz der in einem früheren Abschnitt an den von ihm angewandten Fällungs- und Differenzierungsmethoden geübten Kritik sind seine Ergebnisse auch heute noch so wertvoll, daß sie kurz zusammengefaßt Erwähnung finden sollen.

Die wichtigsten Ergebnisse, die für uns hier besonders in Betracht kommen, sind folgende: Bis zur Gelbreife erstreckt sich das Entwicklungsstadium, von der Gelbreife an beginnt das Reifestadium. Bei einem normalen, nicht zu langen noch zu kurzen Entwicklungsverlauf nehmen von der Gelbreife zur Vollreife die tryptischen, peptischen und löslichen Stickstoffverbindungen ab, die unlöslichen dagegen zu. Das Stadium der Vollreife ist nach Schjerning dann erreicht, wenn die Umwandlung der löslichen Stickstoffverbindungen in unlösliche aufgehört oder ein Maximum erreicht hat. Das gleiche gilt auch quantitativ bezüglich des Gesamtgehaltes an Asche und freier Säure nur mit dem Unterschied, daß uns über die Beziehungen zwischen löslichen und unlöslichen Gruppen oder Einzelkörpern dieser Substanzklassen nichts bekannt ist. Ferner konnte Schjerning aus seinen Versuchen folgern, daß, wenn die Entwicklungsperiode des Kornes von kurzer Dauer war, der Zahlenwert für den Prozeß des Eiweißaufbaues stets höher ist, als der

für die Stickstoffzufuhr, während es gerade umgekehrt ist, wenn die Periode lange dauert. In einer Periode von normaler Dauer haben dagegen die beiden Prozesse fast gleiche Zahlenwerte. Mit anderen Worten, wenn die Entwicklung des Kornes von der Grünreife zur Gelbreife in einer normalen Zeitdauer stattfindet, dann besteht ein Gleichgewichtszustand zwischen der in einer bestimmten Zeit zugeführten und der in der gleichen Zeit in unlösliche Proteinsubstanzen übergeführten Stickstoffmenge. So geht also Entwicklung und Reife Hand in Hand. In einer Periode von kurzer Entwicklungsdauer aber geht der Aufbau von löslichen Stickstoffsubstanzen in unlösliche mit größerer Schnelligkeit vor sich, als die Stickstoffzufuhr zum Korn, d. h. die Reife fängt schon bald an, den Entwicklungsprozeß zu überwiegen. Bei einer langen Entwicklungsperiode endlich überwiegt die Aufnahme des Stickstoffes über den Aufbau, oder die Reifung findet außerordentlich langsam statt. Auch findet während einer langen Entwicklungsdauer der tryptische Aufbau in schwächerem Maße statt als bei einer kurzen Entwicklungsperiode. Klimatische Verhältnisse üben einen merklichen Einfluß auf den Stickstoffaufbau und den Verlauf der Entwicklung und Reifung aus. Ein warmer und trockener Sommer gibt im allgemeinen einen vollkommeneren Stickstoffaufbau als ein kalter und nasser Sommer. Normale Entwicklung vorausgesetzt, findet man kurz vor der Gelbreife das Maximum der aufbauende Prozesse im Korn. Der Übergang zwischen Entwicklungs- und Reifungsperiode ist also bei der Gelbreife ein deutlicher, bei sehr langer Vegetationszeit verschwindet er. Überreife am Halm äußert sich durch den entgegengesetzten Verlauf der Reifung, es kommt wieder zu einem Abbau, zu einer Zerstörung des aufgebauten Materials. Während der Reife ist der Proteinaufbau größer als der Albuminaufbau, während bei der Entwicklungsperiode das Umgekehrte der Fall ist.

In neuerer Zeit befaßten sich Fink und Kunisch (26) mit den während der Reifung vor sich gehenden Stoffeinlagerungs- und Aufbauvorgängen. Hier interessieren die Stickstoffverhältnisse, welche nach den von Bishop (18) ausgearbeiteten Differenzierungsmethoden verfolgt wurden. Für den Proteingehalt des Kornes erweist sich die Wasserversorgung im Mai als besonders wichtig. Mangel an Niederschlägen führt ziemlich sicher zur Erhöhung des Stickstoffgehaltes. Bei ausreichender Feuchtigkeit während Wachstum, Kornausbildung und Reife besteht Neigung zu stärkerer Glutelinbildung.

Der Glutelingehalt bleibt zurück, wenn bei ausreichender Feuchtigkeit im Mai und Juni während der letzten Phase, der Reifung, im Juli Dürre einsetzt. Das Glutelin hat allem Anschein nach Bedeutung für die vegetative Entwicklung. Daher begünstigt starke vegetative Entwicklung der Pflanze und der Kornanlage die Glutelinbildung und somit ist der Glutelingehalt um so höher, je länger durch ausreichende Niederschläge der vegetative Charakter erhalten bleibt. Setzt frühzeitig starke Wärme bei ausreichender Feuchtigkeit ein, so ist damit zu rechnen, daß im Stadium der Gelbreife der Aufbauvorgang ganz oder fast ganz beendet ist. Wird dieser Zustand durch schnelles Austrocknen fixiert, so ist nur mehr mit geringen Veränderungen während des Verbleibens der Körner am Halm und bei der Lagerung zu rechnen. Allzu früher Wasserverlust bei gleichzeitiger Wärme führt zu einer Störung des normalen Ablaufes der Aufbauvorgänge, deren Folge unreife Gersten sind, wofür die Jahrgänge 1904 und 1911 bekannte Beispiele sind. In solchen Gersten ist das normale Gleichgewicht von Einlagerung und Aufbau gestört, es finden sich in ihnen verhältnismäßig viel niedermolekulare Substanzen, auch N-Verbindungen vor, die zwar anfänglich dem Keimling beim Mälzen rasches Wachstum erlauben, mit dem jedoch die Enzymproduktion nicht Schritt hält, sodaß das Wachstum zum Stocken kommt.

Bekanntlich besitzt die Gerste bei ihrer Ernte zwar die botanische, noch nicht aber die physiologische Reife. Die letztere erhält sie erst, je nach Sorte und Wachstumsbedingungen, nach einer 4 bis 8 wöchentlichen Lagerzeit, nach welcher sie ihre volle Keimfähigkeit und damit Vermälzbarkeit erlangt. Während dieses Keimreifungsprozesses gehen die Aufbauprozesse weiter, es lassen sich Kondensationsreaktionen niedermolekularer zu höher molekularen Verbindungen nachweisen. Für die Stickstoffverbindungen verfolgte H. Lüers (45) derartige Kondensationen mit Hilfe der Formoltitration. Der formoltitrierbare Amidstickstoff nahm während der Keimreife ab und zwar im allgemeinen um so mehr, je weiter die beobachteten Gerstenproben von ihrer Keimreife entfernt waren. Auch der auf einem Wärmereiz beruhende Erfolg einer künstlichen Trocknung und die damit bewirkte Förderung der Keimreife ließ sich analytisch auf die gleiche Weise aufzeigen.

b) Hopfen.

Die Gesamtmenge des Stickstoffs in der Hopfentrockensubstanz beträgt 2 bis 4% oder auf Protein umgerechnet 12—24%. Davon sind ein Drittel bis knapp die Hälfte in heißem Wasser löslich und zwar

in Form von Albumosen und Peptonen, Polypeptiden und Aminosäuren. Von niedrigmolekularen Stickstoffverbindungen wurden von Chapman (46) Histidin, Arginin, Betain, Adenin und Hypoxanthin nachgewiesen. Asparagin, ein vorzüglicher Hefenährstoff, kann bis zu 30% des Gesamt-Hopfenstickstoffs ausmachen. Auch Cholin kommt in geringer Menge im Hopfen vor, desgleichen Trimethylamin in altem, erhitzten Hopfen.

Die niedrig molekularen Stickstoffverbindungen des Hopfens sind zum größten Teil für die Hefe sehr gut assimilierbar. Der Verlust, den die Würze beim Hopfenkochen durch Koagulation hochmolekularen, nicht assimilierbaren Malzeiweißes erleidet, wird durch das Inlösungsgehen von leicht assimilierbaren Stickstoff aus dem Hopfen nicht nur quantitativ aufgewogen, sondern qualitativ überkompensiert.

B. Mälzerei

a) Weiche.

Während des Weichens der Gerste erfolgt eine Auslaugung der Spelze, von der nach den Studien von Lüers und Stauber (47) auch der Stickstoff betroffen wird. Von kaltem, destillierten Wasser wird nur wenig Stickstoff aus der Spelze gelöst. Steigende Temperatur von 17,5 bis 100° fördert die Lösung nicht nennenswert. Lange Zeit (45 Std.) erhöht die Auslaugung. Laktatpuffer von pH 5 erhöht die Lösung im Vergleich zu reinem Wasser, 0,25%ige Salzsäure steigert sie weiter, jedoch werden alle diese Maßnahmen von 0,25%iger Kalilauge, noch dazu wenn diese warm angewandt wird, übertroffen. Damit erklärt sich der qualitätsfördernde Einfluß einer alkalischen Warmwasserweiche nach Moufang (28), die nicht nur das Spelzenprotein (die Testinsäure), sondern auch Gerbstoffe, Bitterstoffe, Farbstoffe, Pentosane, Mineralstoffe u. a. m. der Spelze entzieht. Auch gesättigtes Kalkwasser (0,14%ig) hat ebenfalls ein gutes Lösungsvermögen für den Spelzenstickstoff.

Weitere Versuche über die Auslaugung durch verschiedene Weichwässer stammen von K. Mündler (48), die an Modellversuchen ausgeführt zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie die oben genannten Autoren erhielten, führten. Kalilauge löst organische Stoffe wie N-Verbindungen, Farbstoffe und Gerbstoffe immer stärker als gleich starke Säuren. Säuren besitzen bei pH 3—3,5 (gemessen im Weichwasser) ein Minimum an Löslichkeit, auch bezüglich der N-Verbindungen.

b) Keimung.

Für die Lebensfunktion des keimenden Kornes nehmen die Proteine und Stickstoffverbindungen die erste Stelle ein, denn sie sind mit vollem Recht als die eigentlichen Träger des Lebens anzusprechen.

Wie bereits bei der Gerste erwähnt, kommt das Eiweiß histologisch in verschiedenen Formen vor, nämlich einmal in der Kleber- oder

Aleuronschicht, das während des kurz befristeten Keimungsvorganges der technischen Mälzerei keine Rolle spielt und ziemlich unverändert in die Trebern geht. Dann das unter der Aleuronschicht abgelagerte Reserveweiß, dessen Menge in ziemlich weiten Grenzen schwanken kann. Dieses Eiweiß dient dem Keimling vornehmlich als Stickstoffnahrung. Schließlich das in den Endospermzellen als Überrest des einstigen Protoplasmas abgelagerte histologische Eiweiß, das erst in zweiter Linie zur Ernährung des Keimlings nutzbar gemacht wird. Die Mobilisierung des im Endosperm abgelagerten Eiweißes erfolgt, ebenso wie im tierischen Organismus, durch Löslichmachung und Abbau zu einfachen niedermolekularen Bausteinen unter Mitwirkung verschiedener proteolytischer Enzyme. Aus den diffusionsfähigen Spaltprodukten baut sich der Keimling sein Eiweiß wieder auf, wobei er zur Synthese allenfalls sonst noch benötigte organische Gruppen z. B. aus dem Reich der Kohlehydrate oder anorganische Stoffe wie Phosphor und Schwefel zu Hilfe nehmen kann. Die zur Synthese des Eiweißes erforderliche Energie bestreitet er aus der Verbrennung von Kohlehydraten im Atmungsprozeß.

Die Bedeutung des Eiweißes hat man im Braugewerbe schon lange erkannt, doch betrachtete man in früheren Zeiten die Eiweißfrage in erster Linie vom quantitativen Standpunkt, indem man den Zusammenhängen zwischen Proteingehalt der Gersten und der Extraktausbeute in erster Linie Beachtung schenkte. Auf diese Verhältnisse wurde bereits anlässlich der Eigenschaften und der Beurteilung der Gerste eingegangen. Heute jedoch beansprucht die Eiweißfrage hauptsächlich vom qualitativen Standpunkt aus unser Interesse. Für eine Reihe von Eigenschaften des Bieres z. B. Schaumhaltigkeit, Vollmundigkeit, Neigung zu Trübungen, um nur einige zu nennen, ist nicht so sehr der Gesamtproteingehalt einer Gerste, sondern vielmehr die Menge der einzelnen Proteinindividuen und das Ausmaß ihrer Umwandlungen in Mälzerei und Sudhaus von Bedeutung.

Im Gegensatz zum enzymatischen Stärkeabbau ist die analytische Beschäftigung mit dem Proteinabbau verhältnismäßig jüngeren Datums und führte erst zu wirklichen Erfolgen, als mit fortschreitender Entwicklung der Enzymchemie auch die Methoden der Verfolgung des Eiweißstoffwechsels zuverlässiger wurden.

Die älteren Arbeiten auf diesem Gebiet, so sehr sie für ihre Zeit wertvoll und mit viel Mühe ausgeführt worden waren, haben heute völlig an Bedeutung verloren. Es muß genügen auf die wichtigsten

lediglich hinzuweisen, es sind dies z. B. die Veröffentlichungen von Vines (49), Weiß (5), Lundin (51), Windisch und Schellhorn (52), Schjerning (15), welche mit anderen zusammen von A. Hesse (35) referiert und ausführlich kritisch gewertet worden sind. Zum Verständnis des Proteinabbaues in Mälzerei und Sudhaus ist die Kenntnis der im Malz wirkenden Proteasen erforderlich, worüber aus jüngerer Zeit eine Reihe von aufschlußreichen Veröffentlichungen vorliegen.

1. Die proteolytischen Enzyme der keimenden Gerste.

Bezüglich der Einteilung der Gruppe der Proteasen sei auf den allgemeinen Teil (S. 23) verwiesen. Dort sind auch die wesentlichsten Methoden, nach welchen die Proteolyse verfolgt werden kann erwähnt, nämlich Bestimmung der Aminogruppen mit salpetriger Säure nach D. D. van Slyke, Formoltitration nach Sörensen, direkte Titration der Carboxylgruppen in Alkoholüberschuß nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz. Dazu kommt noch die Titration der Aminogruppe nach Azetonzusatz nach Liderström-Lang (53).

Außer diesen allgemeinen Methoden haben sich noch einige spezielle entwickelt. So läßt sich z. B. die Abnahme der Gelatineviscosität als Maß für die Proteinaseaktivität verwerten, was Koch, Nelson und Ehrnst (54), sowie Landis und Frey (55) für die Bestimmung von Malz- und Cerealienproteinasen ausnützen. Komazawa (56) verfolgt den Abbau des Caseins durch Malzproteasen, indem er das unverdaute Casein durch Zitronensäure fällen und bestimmt. L. Idoux (57) benützt als Substrat durch Erhitzen inaktiviertes Gerstenmehl und betrachtet den löslich gewordenen Stickstoff als Maß für die Aktivität der proteolytischen Enzyme. Kolbach und Simon (58) ermitteln die proteolytische Kraft von Malzauszügen mit Edestin als Substrat und Bestimmung des daraus dauernd löslich gewordenen Stickstoffs nach Kjeldahl. Weitere Möglichkeiten, die Wirkung der Proteasen beim Keimen und Maischen zu verfolgen, bestehen darin, die in Lösung gegangenen oder weiter umgewandelten Stickstoffverbindungen durch Fällungs- oder Adsorptionsreaktionen (Schwermetall-Mg-Salze, Tannin, Kohle etc.) zu differenzieren, worauf später noch eingegangen wird.

Nach diesen orientierenden Ausführungen über die Proteasen im allgemeinen soll nun zur Besprechung der eiweißabbauenden Enzyme der keimenden Gerste übergegangen werden. Auf die älteren, oben bereits zitierten Arbeiten braucht nicht mehr Rücksicht ge-

nommen werden, da sie entweder mit unzulänglicher Methodik ausgeführt wurden oder ihnen heute überholte Vorstellungen über die Natur der Proteasen zugrunde liegen. In neuerer Zeit haben sich ziemlich gleichzeitig und von einander unabhängig eine größere Zahl von Forschern mit den Proteasen des Grünmalzes beschäftigt und sind dabei zu übereinstimmenden Ergebnissen gelangt. Diese Forscher sind Lüers und Malsch (59), v. Euler, S. Myrbäck und K. Myrbäck (60), Linderström-Lang und Mill (61), Ambros und Harteneck (62), sowie Hopkins (63). Nach den Feststellungen dieser Autoren kommen im keimenden Gerstenkorn eine Proteinase und mindestens zwei Peptidasen vor.

Die Proteinase der Gerste und des Malzes gehört ihren Eigenschaften nach zum Typus des im Pflanzenreich weit verbreiteten Papains. Dieses Enzym ist durch sein Wirkungsoptimum bei pH etwa 5 ausgezeichnet. Es greift isoelektrisches Eiweiß an. Je nach dem als Substrat verwendeten Eiweißkörper schwankt das pH-Wirkungsoptimum etwas, wie folgende Tabelle zeigt:

Gelatine	pH 4,9—5
Edestin	„ 4,3
Eialbumin-Pepton	„ 4,8
Eialbumin	„ 4,6
Wittepepton	„ 4,6
Casein	„ 3,5—5,7

Wie das Papain wird auch die Gerstenproteinase durch Blausäure um etwa 50% in ihrer Wirkung aktiviert, wobei mit Gelatine als Substrat das pH-Optimum von 4,9 auf 4,6 bis 4,7 verschoben wird. Ebenso gelingt eine Aktivierung durch Schwefelwasserstoff und Thiole (Glutathion). Bei pH=5 läßt sich die Proteinase optimal an Tonerde A, weniger gut an Tonerde C γ adsorbieren und durch Elution mit sekundärem Natriumphosphat ganz oder nahezu von den Peptidasen trennen. Auch Kaolin und Eisenhydroxyd sind gute Adsorptionsmittel, welche gleichzeitig eine Anreicherung und teilweise Trennung der Proteinase von den Peptidasen ermöglichen.

Charakteristisch für die Proteinase ist ihre verhältnismäßig gute Temperaturreistenz, wodurch sie sich von den Peptidasen unterscheidet. Ihre beste Temperaturbeständigkeit liegt bei der isoelektrischen Zone der Malzeiweißstoffe, nämlich bei einem pH von 4,4 bis 4,6, bei welchem sie Temperaturen von 60—70° noch kürzere Zeit verträgt, während sie bei pH 6,0 10 Minuten auf 62° erhitzt etwa 80—85% ihrer Aktivität einbüßt. Gegenwart größerer Mengen von Eiweißkörpern scheint ihre Temperaturstabilität zu erhöhen.

Kolbach (loc. cit. 58) untersuchte das Verhalten der Proteinase bei einstündigem Maischen bei verschiedenen Temperaturen, indem er die Filtrate auf Edestin zur Wirkung brachte und den löslich gewordenen Stickstoff bestimmte. Es ergaben sich folgende Resultate:

1 ^h gemaischt bei	Proteolytische Kraft der Filtrate
20°	162
30°	145
40°	98
50°	58
55°	33
60°	10
65°	3
70°	0

Man erkennt aus dieser Tabelle, daß bei einstündigem Erwärmen in wässriger Lösung bereits bei 30° eine wahrnehmbare Schwächung der Proteinase erfolgt. Bei 70° C ist das Enzym in einer Stunde bereits vollständig vernichtet. Lüers, Kraus, Hartmann und Vogt (142) fanden kurz nach dem Einmaischn eines Hochkurzmaischesudes bei 62° C im Maischefiltrat keine proteolytische Kraft mehr, was wohl auf die weniger empfindliche Formoltitration als Bestimmungsmethode zurückzuführen ist.

Die Peptidasen des Grünmalzes unterscheiden sich von der Proteinase sowohl durch ihr pH-Optimum als auch durch ihre Temperaturempfindlichkeit. Sie wirken am besten bei sehr schwach alkalischer Reaktion. So erfolgt die Spaltung des Leucylglycins am besten bei pH 7,5 (Lüers und Malsch, Linderström-Lang und Mill), während nach späteren Beobachtungen von Linderström-Lang und Sato (64), das pH-Optimum der Leucylglycinspaltung bei pH 8,6 liegt. Alanyl-glycin wird optimal bei pH 7,8 gespalten. Bei pH 6,0, dem pH der keimenden Gerste zeigen die Peptidasen noch deutliche Wirkung, bei pH 4,5—5,0, wo die Proteinase am besten wirkt, ist ihre Aktivität bereits erloschen. Beim Erhitzen in wässriger Lösung werden sie bereits bei Temperaturen unter 50° geschädigt und bei 60° rasch zerstört.

Daß im Malz mehrere Peptidasen vorliegen müssen, geht daraus hervor, daß Malzauszug Leucylglycin etwa 15—20 mal, Alanyl-glycin rund 8 mal schneller spaltet als Glycylglycin. Weiterhin fanden Linderström-Lang und Holter (65) mit ihrer sehr subtilen mikrohistochemischen Arbeitsmethode, daß das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit welchem Alanyl-glycin und Leucylglycin gespalten wird, entlang der Primordialwurzel stark wechselnde Werte

aufweist. Es ist am kleinsten in der Wuchszone der Wurzelspitze und am größten in den übrigen Teilen der Wurzel. Die gleichen Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die Peptidaseaktivität der Primordialwurzel jeweils ein scharfes Maximum 0,8 mm von der Wurzelspitze entfernt besitzt und somit im Zusammenhang mit dem Längenwachstum der Wurzel steht. Von Interesse ist schließlich noch die Feststellung, daß die Peptidasen nur an den Orten des Wachstums, nämlich in der Wurzel, dem Blattkeim, dem Schildchen und angrenzenden Gewebe, nicht jedoch im Endosperm oder der Aleuronschicht zu finden sind.

Proteinase und Peptidasen sind zu einem Teil wasserlöslich, liegen also als Lyoenzyme vor. Daneben findet sich aber ein erheblicher Teil an die Zellstruktur gebunden vor (Desmoenzyme), wie Kolbach (66) nachweisen konnte. Gerade für diese in den Zellen verankerten proteolytischen Enzyme muß man eine höhere Temperaturreistenz annehmen, was für die Proteolyse im Sudhaus von Bedeutung ist.

Außer den bisher besprochenen Proteinase und Peptidasen haben nun Blagoveschensky und Sossiedow (67), Holter (68), Northrop (69) und Kosmin (70) die Beobachtung gemacht, daß in Getreidesamen, auch im Pepsin, eine proteolytische Komponente vorkommt, welche sehr stark desaggregierend auf hochmolekulare Eiweißkörper, wie Gliadin-Glutenin oder Gelatine wirkt, ohne daß damit der Amino-stickstoff auch nur annähernd im gleichen Maße zunimmt. Lüers und Hüttinger (71) und Lüers und Löther (72) konnten diesen Befund an Malzauszügen bestätigen. Es läßt sich leicht zeigen, daß Malzauszug die Viskosität einer Gelatinelösung in kurzer Zeit sehr stark herabsetzt, während der in der gleichen Zeit gebildete Amino-stickstoff ganz unbedeutend ist. Rein physikalisch-chemisch desaggregierende Enzyme sind bis heute nicht bekannt und es ist auch sehr unwahrscheinlich, daß es solche gibt, denn bisher ist jede Enzymwirkung auf eine bestimmte chemische Reaktion zurückzuführen. Nachdem aber die desaggregierende Wirkung dieser Proteinasekomponente außer Zweifel steht, müssen wir annehmen, daß entweder die Lösung einiger weniger, analytisch kaum mit Sicherheit zu erfassender Peptidbindungen bereits zum Zerfall der großen, die Viskosität z. B. der Gelatinelösung bedingenden Eiweißkomplexe in kolloidchemisch kleinere führt, oder aber daß außer den Aminogruppen noch andere, z. B. SH-Gruppen, die Verknüpfung der Eiweißkörper niederen Molekulargewichtes zu den großen Mizellen besorgen. Bevor hier nicht eine weitere Klärung erfolgt ist, besteht kein Anlaß besondere desaggregierende Enzyme („Gelatina-se“) anzunehmen.

Zu den Eiweißkörpern sind auch die Nucleoproteine zu zählen, worüber im allgemeinen Teil bereits berichtet wurde. Die den Nucleoproteinen zugrunde liegenden Nucleinsäuren unterliegen ebenfalls dem enzymatischen Abbau und zwar spalten Polynucleotidasen (oder Nucleinasen) die Polynucleotide in Nucleotide.

Nucleotidasen die Nucleotide in Nucleoside und Phosphorsäure und Nucleosidasen die Nucleoside in Base und Kohlehydrat.

Von diesen ohne Zweifel auch beim Keimungsvorgang wirkenden Enzymen sind bisher nur Nucleotidasen festgestellt, sie gehören jedoch nicht zu den Proteasen sondern zu den Phosphatasen.

Wie nahezu sämtliche Enzyme erfahren auch die Proteasen während der Keimung eine Zunahme ihrer Aktivität. Während man jedoch bei den meisten Enzymen diese Zunahme unmittelbar durch Fermentaktivitäts- oder Konzentrationsbestimmungen an geeigneten Substraten zahlenmäßig verfolgen konnte, sind derartige Untersuchungen an den Proteasen nur spärlich vorgenommen worden. Waldschmidt-Leitz und Purr (73) verfolgten die Aktivitätszunahme der Proteasen im Vergleich zur Amylase während der Keimung und fanden folgende prozentuale Zunahmen:

	Amylase	Proteinase	Aminopoly-peptidase	Dipeptidase
Ungekeimte Gerste	0	0	0	0
Geweichte Gerste	0	42	0	0
spitzende Gerste	11	63	0	0
Wurzelkeimlänge	1 cm 140	290	230	240
„	2 cm 1700	230	65	50
„	4 cm 1350	260	90	90
„	7 cm 1200	330	210	100

Daraus ist ersichtlich, daß die Entwicklung der proteolytischen Enzyme bereits in den ersten Keimstadien sehr kräftig einsetzt und der Entwicklung der Amylaseaktivität deutlich vorausseilt. Die Proteasen sind an der Freilegung der Amylase aus inaktiver Bindung wesentlich beteiligt.

2. Der Eiweißabbau beim Mälzen.

Außer diesen Beobachtungen über eine unmittelbare Steigerung der Proteasenaktivität während der Keimung liegen zahlreiche Feststellungen im Schrifttum vor, welche auf Veränderungen der korn-eigentümlichen Stickstoffverbindungen abzielend, auf mittelbarem Wege von der Tätigkeit der Proteolyse während der Keimung Zeugnis ablegen. Und gerade solche Ermittlungen sind es vornehmlich, die das Interesse des Brauers in Anspruch nehmen. Folgen wir insbesondere den Studien von Bishop (18), Fink und Kunisch (26), Takahashi und Shirahama (74), Rose und Anderson (75), so stellen sich die Veränderungen, welche die einzelnen Stickstoffgruppen im Verlauf der Keimung erfahren, folgendermaßen dar:

Einleitend muß darauf hingewiesen werden, daß eine Auffassung Osborne's (1), wonach das Hordein der Gerste beim Keimen in einen neuen Eiweißkörper, daß Bynin übergeht, nicht zu Recht besteht. Lüers (76) untersuchte die beiden Eiweißkörper auf ihre Stickstoffverteilung nach van Slyke und fand sie sehr weitgehend übereinstimmend. Auch aus dem regelmäßigen Verlauf der Abnahme des Hordeins, welchen schon früher Kraft (77) verfolgte, ergab sich kein Anhaltspunkt für das Auftreten eines neuen Eiweißkörpers während der Keimung. Auch Bishop (loc. cit. 18) führt ähnliche Argumente wie Lüers für die Identität beider Proteine ins Feld, sodaß wir heute diese Angelegenheit als erledigt betrachten dürfen. Auch hinsichtlich des Edestins, von dem Osborne glaubte, es gehe bei der Keimung in Bynedestin über, gilt das gleiche.

Das Wesentliche bei der Proteinlösung in der Mälzerei ist nun die Tatsache, daß die beiden unlöslichen Eiweißkörper der Gerste Hordein und Glutelin zu einem erheblichen Teil, allerdings nicht etwa vollständig in salzlösliche Eiweißkörper umgewandelt werden. Dabei geht die Löslichmachung der beiden Proteine nicht gleichförmig von statten, sondern anfänglich ist der Hordeinabbau besonders kräftig, wird dann aber im weiteren Verlauf der Keimung schwächer und bleibt dann hinter dem allmählich immer stärker werdenden Glutelinabbau zurück. Der Glutelinabbau setzt erst mit beginnender Blattkeimentwicklung ein, verstärkt sich mit fortschreitendem Blattkeimwachstum und läßt dann, langsamer als der Hordeinabbau, gegen Ende der Keimzeit wieder nach. Aus den salzlöslichen Abbauprodukten von Hordein und Glutelin baut der Keimling sich nur das Glutelin wieder auf. Auf diese Weise wird der tatsächliche Abbau des Glutelins bei der Analyse des ganzen Kornes verdeckt. Die Menge des neu aufgebauten Glutelins wird von der Intensität

des Blattkeimwachstums beherrscht. Je länger die Keimzeit ist und je länger der Blattkeim sich entwickelte, desto mehr Glutelin wird während der Mälzung wieder aufgebaut. Differenziert man den salzlöslichen Stickstoff, wie dies Bishop tat, in weiteren Fraktionen, so sieht man, daß aus den beiden Proteinen Hordein und Glutelin einfachere mit der Bezeichnung „Nicht-Eiweißstickstoff“ belegte Abbaustufen entstehen. Zwischen dem Abbau der Eiweißkörper und ihrem Aufbau im Keimling stellt sich etwa am fünften Keimtag, normalen Keimverlauf vorausgesetzt, ein Gleichgewichtszustand ein, der durch folgende von Bishop gegebenen Analysendaten gekennzeichnet ist.

	Gerste in % des Ges. N.	Malz
Nicht-Protein-Eiweiß (Aminosäuren)	7	32
Proteosen	5	9
Albumin	13	10
Globulin (Edestin)	10	11
Hordein	37	17
Glutelin	30	21

Während diese Analysendaten sehr eindrucksvoll die Verhältnisse im statischen Gleichgewicht veranschaulichen, geben die folgenden von Takahasi und Shirahama stammenden Zahlen einen Einblick in das dynamische Geschehen bei der Keimung.

Keimdauer Std.	0	24	48	72	120
wasserlösl. + 10%					
NaCl lösl. N.	23,3	29,3	38,8	42,8	51,6
70% Alkohollösl. N					
(Hordein)	21,4	10,5	10,0	6,1	2,2
0,2% NaOH lösl. N					
(Glutelin)	32,5	33,7	28,8	16,8	22,5
Blattkeim- entwicklung		etwas angeschwoll.	3-5 mm 16%	5-6 mm 60%	9-12 mm 100%

Lüers und Loibl (loc. cit. 78) stellten den Abbau der Proteine im Verlauf der Keimung zu einfachen nicht mehr Proteinnatur besitzenden Verbindungen an dem gewaltigen Anstieg des formoltitrierbaren Stickstoffs fest, wobei aber ebenfalls berücksichtigt werden muß, daß der gleichzeitig erfolgende Aufbau von Glutelin in der Keimanlage auch hier die tatsächlichen Werte verkleinert erscheinen läßt. Weiterhin fanden die genannten Autoren, daß der gesamtlösliche Stickstoff und der koagulierbare Stickstoff beide in einem zueinander konstant bleibenden Verhältnis bei der Keimung zunehmen, woraus

man den Schluß zu ziehen geneigt ist, daß die aus den unlöslichen Proteinen zunächst entstehenden echten, löslichen Proteine in dem Maße ihres Entstehens auch weiter abgebaut werden.

Da die Formoltitration nur den Amidstickstoff in seiner Gesamtheit umfaßt, aber nicht differenziert zwischen Aminosäure-N, Dipeptid- oder Polypeptid-N, hat E. Schild (79) auf Veranlassung des Verfassers einige colorimetrisch zuverlässig bestimmbare Aminosäuren wie Cystin, Tyrosin und Tryptophan im Verlauf der Keimung quantitativ ermittelt und sie in Vergleich zum formoltitrierbaren Stickstoff gesetzt. Das Ergebnis enthält folgende Tabelle:

In 100 g Trockensubstanz sind enthalten:

Keimtag

	Gerste	aus- gew.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Darr- malz
Extrakt in g	7,83	5,45	6,10	8,46	12,36	13,40	15,40	15,89	16,37	16,68	16,87	17,44	16,83
löslicher N mg	228	187	217	250	396	432	465	462	472	469	480	490	443
koagul. N mg	77	46	63	69	88	98	122	137	134	135	140	135	101
dauernd Isl. N mg	151	141	154	181	380	334	343	335	338	334	340	355	342
Formol N mg	19,2	22,7	28,7	49,0	104	116	122	120	111	111	114	119	112
Cystin N mg	8,4	7,0	8,7	8,1	10,6	11,9	13,2	12,7	12,8	12,5	12,9	13,1	15,8
Tyrosin N mg	1,7	1,7	1,5	2,7	4,9	6,0	5,7	5,1	5,6	5,9	5,1	6,0	6,1
akt. Tryptophan N mg	2,9	2,2	2,4	2,5	2,6	3,4	3,1	3,6	3,9	3,2	4,4	3,6	3,7
Summe des N der 3 Aminosäuren mg	13,0	10,9	12,6	13,3	18,1	2,3	22,0	21,4	22,3	21,6	22,4	22,7	25,6
Diese Summe in % des Formol N	68	53	44	27	17	17	17	17	18	18	18	17	23

Diese Tabelle läßt die Veränderungen der Stickstoffsubstanzen bei der Keimung sehr gut in Erscheinung treten. Man sieht, daß der gesamtlösliche Stickstoff während der Weiche infolge Herauslösens aus dem Korn bzw. den äußeren Anteilen abnimmt. Der Verlust an hochmolekularem, nämlich koagulierbarem Stickstoff in der Weiche ist geringer als der Verlust an Gesamt-N, sodaß auch niedrigmolekulare N-Substanzen gelöst worden sind. Allerdings darf man, wie Kolbach und Antelmann (loc. cit 80) mit Recht kritisch bemerken, der Ermittlung des koagulierbaren Stickstoffs nicht zu viel Wert beilegen, weil das veränderte Salzmilieu sie unsicher gestaltet. Wenn nun der Formolstickstoff anstatt eine zu erwartende Abnahme eine deutliche Zunahme zeigt, so beruht dies darauf, daß bereits während der Weiche ein enzymatischer Eiweißabbau einsetzt. Man kann immer wieder, so auch hier die Beobachtung machen, daß die Entwicklung der proteolytischen Funktionen jenen anderer enzymatischer Kräfte (wie Amylase) erheblich vorseilt, dafür aber dann etwa am 4. bis 5. Keimtag schon das Maximum erreicht.

Interessant sind nun außer dem allgemeinen Ansteigen des löslichen, koagulierbaren und dauernd löslichen Stickstoffs die Verhältnisse für den Aminostickstoff. In der Gerste sind keine oder nur geringe Mengen von Polypeptiden vorhanden. Der geringe Formol-Stickstoffgehalt rührt wahrscheinlich nur von Aminosäuren her. Während des Keimens verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Polypeptide, denn die Aminosäuren (Cystin, Tyrosin, Tryptophan) steigen im Gegensatz zum Formol-N nur geringfügig an. Die Eiweißabbauprodukte, welche man durch die Formoltitration erfaßt, sind also sehr verschieden zusammen gesetzt, in der Gerste bestehen sie fast nur aus Aminosäuren, während bei fortschreitender Keimung die Polypeptide überwiegen. Die Bildung der Aminosäuren während der Keimung ist viel größer als die obige Tabelle erkennen läßt, denn ein nicht unbeträchtlicher Teil derselben wird zum Aufbau von Eiweißsubstanzen im Keimling verwendet.

Auch der mit etwa 3—4 mg in 100 g Trockensubstanz nur sehr geringfügige, aber immerhin etwa 10—12% des Formolstickstoffs betragende Ammoniakstickstoff der Gerste erfährt nach Windisch, Kolbach und Schild (81) während der Keimung eine Zunahme auf etwa 6 mg oder um 64%, was wohl in erster Linie auf die enzymatische Abspaltung von Ammoniak aus Säureamidbindungen (Asparagin, Glutamin) zurückzuführen sein dürfte. Möglicherweise spielt in geringem Umfang auch eine Desaminierung von Aminosäuren eine Rolle.

Wie bereits oben erwähnt wurde, nimmt bei normalem gleichmäßigem Wachstum der salzlösliche Stickstoff anfangs stark zu, jedoch findet keine stetige Anreicherung im Mehlkörper statt, sondern mit fortschreitender Keimung erfolgt sogar eine geringe Abnahme des salzlöslichen Stickstoffs im Mehlkörper, wenn man ihn prozentual auf den Gesamt-N des ganzen Korns bezieht. Ein kontinuierliches Anwachsen des salzlöslichen Stickstoffs konnte dagegen von Fink und Kunisch (loc. cit. 26) in der Keimanlage beobachtet werden. Eine Einschränkung des Keimlingswachstums hat zur Folge, daß sich der salzlösliche Stickstoff im Mehlkörper anreichert, weil in diesem Fall das Gleichgewicht zwischen Abbau im Mehlkörper und Aufbau im Keimling gestört ist. Aus diesem Befund darf man eine Bestätigung für die praktische Erfahrung herleiten, daß die Mälzungsbedingungen zu einer verschiedenartigen Differenzierung des Eiweißabbaues führen. So ist z. B. durch Studien von Schjerning (82), Lüers (83), Krauß (84), Kolbach (85) und manchen andern bekannt, daß eine kalte, langsame Keimung gegenüber einer warmen, rascheren eine stärkere Eiweißlösung zur Folge hat. Dies erklärt sich

einerseits daraus, daß kaltgeführte Malze immer reicher an proteolytischen Enzymen sind, damit an sich schon zu einem kräftigeren Eiweißabbau führen müssen und andererseits daraus, daß, wie wir sahen, ein langsames, zurückgehaltenes Keimlingswachstum zur Anreicherung salzlöslicher Eiweißverbindungen im Mehlkörper infolge Verringerung der Eiweißsynthese im Keimling führt. Ein Fall zurückgedrängten Blatt- und Wurzelkeimwachstums liegt in der Praxis des Kohlensäurerastverfahrens vor, wo nach 4—5tägiger normaler Keimung das Wachstum und damit die aufbauende Tätigkeit der Keimanlage fast gänzlich zum Stillstand kommt, während die Enzyme noch ungestört weiter wirken können, sodaß es hier zu einer Anreicherung von Eiweißabbauprodukten im Mehlkörper kommen muß. Lüers (86) fand im Vergleich mit normalen Malzen aus gleicher Gerste in Kohlensäurerastmalzen durchschnittlich höhere Formol-Stickstoffwerte, was die Theorie bestätigen würde. Umgekehrt muß ein langgeführtes Malz mit kräftiger Blattkeimentwicklung zu einem höherem Glutelingehalt infolge der Aufbauprozesse in der Keimanlage führen als es bei einem kurzgewachsenen Malz der Fall ist. Folgende von Hofman-Bang stammende, von Fink und Kunisch (loc. cit. 26) zitierten Analysen von hellen und dunklen Malzen beweisen dies sinnfällig.

Malztyp	Eiweiß % Tr. S.	N in % des Ges. N		
		salzlösl.	Hordein	Glutelin
hell	8,82	59,3	18,8	21,9
hell	9,08	54,4	18,9	26,7
dunkel	8,90	47,6	22,3	30,1
dunkel	9,36	44,7	20,9	34,4

Bei forcierten Malzen, also solchen, die einem unnatürlich beschleunigten Wachstum unterworfen waren, ist mit einem relativ geringen Aufbau der löslich gewordenen Eiweißstoffe zu Glutelin zu rechnen, dagegen liegt der salzlösliche Stickstoff entsprechend dem Zuwachs an Blattkeimmasse hoch. Forcierte Malze sind erfahrungsgemäß keine Qualitätsmalze. Ihr von der Norm abweichender Eiweißabbau läßt einen Einblick auf wissenschaftlicher Basis in das bei der Herstellung solcher Malze obwaltende physiologische Geschehen zu.

Während man über die Veränderungen des Hordeins und des Glutelins während der Keimung durch die verschiedenen oben referierten Studien sehr gut unterrichtet ist, haben hinsichtlich der Globulin-komponenten (Edestin) erst kürzlich Untersuchungen von Säverbörn, Danielsson und Svedberg (siehe Sandegren (4)) näheren Aufschluß gebracht.

Aus den mit Hilfe der Ultrazentrifuge ausgeführten Sedimentationsdiagrammen an Gerste und Malz ging hervor, daß mit Ausnahme der δ -Komponente alle anderen Globulinkomponenten sowohl in Gerste als auch im Malz gefunden wurden. Da die γ -Komponente im Malz in niedrigerer Konzentration als in der Gerste vorlag, muß sie während des Mälzens teilweise abgebaut worden sein. Daß diese Komponente im besonderen angegriffen wurde, ist wohl auf die Tatsache zurückzuführen, daß sie im Embryo lokalisiert ist und folglich durch die beim Keimen gebildeten proteolytischen Enzyme abgebaut wurde. Von den übrigen Komponenten bleibt die β -Komponente augenscheinlich intakt, während die α -Komponente nur sehr schwach angegriffen wird. Es ergibt sich somit der wichtige Befund, daß einige Globulinfraktionen ziemlich unverändert den Keimungsprozeß überdauern.

3. Die Beurteilung der Proteinlösung.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde verschiedentlich bereits auf die Methoden Bezug genommen, mit deren Hilfe eine Verfolgung des Proteinabbaues während der Mälzung möglich ist. Außer den schon erwähnten Stickstoffdifferenzierungsmethoden von Schjerring, Bishop und Lundin haben sich in neuerer Zeit mit diesem Gebiet Kolbach (87), Stadnik (88) K. u. S. Mybäck (89), Fink und Kunisch (26) und Rokita und Gfundner (90) befaßt. Für die Zwecke der Praxis sind die meisten der genannten Verfahren zu langwierig und umständlich, während sie in den wissenschaftlichen Laboratorien ihren Zweck erfüllen und am Platze sind. Aus den Bedürfnissen der Praxis heraus hat man deshalb immer wieder nach einfachen analytischen Hilfsmitteln zur Beurteilung des Eiweißlösungsgrades sich bemüht. So hat als einer der ersten bereits Dinklage (91) versucht, durch eine einfache Differenzierung des Stickstoffs in löslichen und koagulierbaren Stickstoff, ausgedrückt in Prozenten des Gesamt- bzw. löslichen Stickstoffs, Richtlinien für die Beurteilung der Eiweißlösung von Malzen aufzustellen, die in vielen Laboratorien lange Zeit zum Teil gute Dienste leisteten. Folgende Tabelle gibt kurz zusammengefaßt die Normen Dinklages:

	Helle Malze	dunkle Malze
Löslicher N in % des Gesamt-N	29—35	24—30
Koagulierb. N in % des löslichen N.	21—26	16—25
koagulierb. N in % des Gesamt-N.	7—9	4—7

Bishop (92) führte später den dauernd löslichen Stickstoff in Pro-

zenten des Gesamt-Malzstickstoffs sogar als Maßstab für die Auflösung des Malzes ganz allgemein ein und betrachtete Malze mit 30—35% löslichen Stickstoff als zu wenig, solche mit 37—40% als überlöst. Bekannt geworden ist ebenso der von Kolbach (93) eingeführte Eiweißlösungsgrad eines Malzes, welcher den prozentualen Anteil des in die Laboratoriums-Kongreßwürze übergehenden löslichen (nicht dauernd löslichen) Stickstoffs am Gesamt-Malzstickstoff ausdrückt. Malze mit über 41% löslichem Stickstoff sind als sehr gut gelöst, solche mit 35—41% als gut gelöst und solche mit unter 35% als mäßig gelöst zu betrachten. Auch Kolbach gab sich ursprünglich der Hoffnung hin, daß diese einfach zu bestimmende Zahl nicht nur ein Maß für die Eiweißlösung, sondern für die Lösung des Malzes überhaupt darstellen könnte.

Ebenso hat es nicht gefehlt, den ebenfalls sehr genau und genügend einfach festzustellenden formoltitrierbaren Stickstoff zur Beurteilung der Qualität eines Malzes heranzuziehen. Langkammerer und Leberle (94) und in neuerer Zeit insbesondere Menzel (95) haben diese Größe zur Normierung der Malze entweder ganz allgemein oder wenigstens bezüglich ihrer Eiweißlösung herangezogen. Menzel versteht unter der Formolzahl die Milligramme Formol-N in 100 ccm 12%iger Würze und gibt folgende Beurteilungsgrundlage an:

Malze mit Formolzahl über	230	überlöst
„ „ „ von	200—230	gut gelöst
„ „ „ von	180—200	gut gelöst
„ „ „ unter	180	schlecht gelöst.

Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß die Formolzahl mit steigendem Eiweißgehalt der Gersten ansteigt, d. h. daß Malze mit höherem Eiweißgehalt absolut einen höheren Eiweißabbau aufweisen, sodaß für eine zuverlässige Beurteilung auch der Gesamt-Stickstoffgehalt berücksichtigt werden muß. Ähnliche Gesichtspunkte gelten auch für den von Lüers und Geiger (20) gemachten Versuch, den Rest-Hordeinstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs des Malzes als Lösungskriterium heranzuziehen. Nach Bishop steigt der Hordeingehalt der Gersten mit ihrem Gesamtproteingehalt. So besitzt z. B. eine Gerste mit 8% Protein 29,3% Hordein-N, eine solche von 14,0% Protein 40,2% Hordein-N. Der Hordeingehalt der Malze wird demnach sowohl vom Gesamt-Proteingehalt der Gerste, als auch vom Eiweißlösungsgrad während des Mälzens beeinflusst. Im allgemeinen können folgende Richtlinien gegeben werden. Normal gelöste Malze besitzen folgende Hordein-N-Gehalte in % des Malzstickstoffs:

bei 12—13% Protein der Malz-Tr.S.	29 —30 % Hordein-N.
„ 11—12% „ „ „	27,5—28,5% „
„ 10—11% „ „ „	25 —26,5% „
„ 9—10% „ „ „	24 —25 % „

Bei besonders guter Lösung ist der Hordein-N-gehalt niedriger, bei mangelhafter Lösung höher als die angegebenen Normalzahlen.

Leider aber haben sich die Hoffnungen, die man auf die Auffindung solcher Beurteilungsmöglichkeiten ganz allgemein setzte, als etwas trügerisch erwiesen und mußten nach der Kritik, die sie durch Arbeiten von Rokita und Gfunder (90), Thunnäus und Schröderheim (96) Hind (97) und jüngst von Fink und Kunisch (loc. cit. 26) erfuhren, wieder zurückgesteckt werden.

Einigermäßen brauchbar sind solche Normen und zwar in erster Linie für den Eiweißlösungsgrad, wenn Gersten von sehr ähnlicher Provenienz, annähernd gleich hohem Stickstoffgehalt und bei möglichst gleichartiger Verarbeitung in einem Betrieb vermälzt werden. Unter diesen einschränkenden Voraussetzungen lassen sich mit derartigen Normen statistische Werte gewinnen, die von praktischem Nutzen für die einzelnen Betriebe sind. Liegen dagegen verschiedene Gerstenvarietäten vor, so weisen diese, wie die Schweden Thunnäus und Schröderheim in überzeugenden, jahrelangen Mälzungsversuchen zeigen konnten, nicht nur verschiedene botanische und physiologische Eigenschaften auf, sondern sie vermälzen sich auch verschieden und geben Malze mit verschiedenen chemischen und brautechnischen Eigenschaften. Vor allem aber ist die Eiweißlösung eine ausgesprochene Sorteneigenschaft, die von der mechanischen Auflösung wenig beeinflusst wird und infolge dessen als Maß für die Lösung eines Malzes nicht geeignet ist. So gelang es z. B. nicht, durch längeres Mälzen die Stickstoffauflösung der schwedischen Goldgerste bis zu der normalerweise eintretenden Eiweißlösung der Bindergerste zu treiben.

Aus allen neueren Arbeiten geht immer wieder hervor, daß die Gerste bereits maßgebliche Eigenschaften für den Charakter des Bieres mit sich bringt. Am Beispiel der Eiweißkörper hat man zum erstenmal zuverlässig erkannt, wie das Ausmaß ihrer Umwandlungen in Mälzerei und zu einem gewissen Teil sogar noch im Sudhaus von der Quantität und der Qualität der Gerstenproteine beeinflusst wird.

Trotz der zuletzt vorgebrachten einschränkenden Kritik ist aber nichtsdestoweniger die Feststellung der Eiweißlösung mit heran zu ziehen, wenn es sich darum handelt, die Qualität eines Malzes mög-

lichst vielseitig und umfassend zu beurteilen. Nur ist sie allein für diesen Zweck nicht zuverlässig genug, es müssen vielmehr andere Beurteilungskriterien noch mitberücksichtigt werden.

4. Einfluß äußerer Faktoren auf die Eiweißlösung.

Die Ausführungen über die Beurteilung des Eiweißlösungsgrades mußten notwendigerweise bereits eine Reihe von äußeren Faktoren berücksichtigen, welche Einfluß auf die Lösung der Eiweißkörper beim Mälzen gewinnen. Im folgenden sollen diese Faktoren im einzelnen des Näheren gewürdigt werden. Auf den Einfluß der Gerstensorte wurde bereits oben hingewiesen. Dem Brauer ist es aus seiner praktischen Erfahrung heraus längst bekannt, daß sich die einzelnen Gerstensorten hinsichtlich ihrer Löslichkeit im allgemeinen und ihrer Eiweißlösung im besonderen verschieden verhalten. Hopkins und Krause (98) berichten über unveröffentlichte Versuche von Hofmann-Bang aus dem Archiv der Tuborg-Brauerei, denen zufolge sich bei einzelnen Gerstensorten die Eiweißlösung folgendermaßen gestaltet:

Gerstensorte	% des Gesamt-N.		
	Salzlösl. N	Hordein	Abnahme Gerste — Malz
Binder (gute Mälzereigerste)			
Gerste	36,7	36,7	15,4
Malz	50,2	21,3	
Opal (mittelmäßige Gerste)			
Gerste	35,4	35,2	12,5
Malz	51,3	22,7	
Segar (schlechte Gerste)			
Gerste	36,5	35,4	11,5
Malz	47,8	23,9	

Daraus ist ersichtlich, daß der Hordeinabbau bei einer guten Mälzereigerste ein bedeutend stärkerer ist als bei einer ungeeigneten. Die Versuche von Thunnäus und Schröderheim, auf die bereits mehrfach hingewiesen wurde, lassen klar erkennen, daß das Verhältnis zwischen löslichem Stickstoff (in der Kongreßfeinmehlwürze) und dem Gesamtstickstoff des Malzes einen für jede Sorte charakteristischen Wert aufweist, der sich trotz Einflüssen des Jahrganges und des Gesamtproteingehaltes immer wieder der Reihenfolge nach finden läßt.

Bezüglich der Korngröße liegen Beobachtungen von Piratzky und Wiecha (99) vor, wonach große Körner mit über 2,8 mm Durchmesser, die eiweißreicher als kleinerkörnige waren, in der Eiweißlösung gegenüber kleineren deutlich zurückblieben, was die Autoren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den geringeren Enzymgehalt dieser Körner zurückführen.

Der Einfluß der Keimungstemperatur wurde oben bereits kurz gestreift. Bereits Schjerning (loc. cit. 82) konnte in weiter zurückliegenden Arbeiten feststellen, daß kältere Haufenführung eine bessere Eiweißlösung bewirkt als eine wärmere und daß die günstigsten Temperaturen zwischen 13 und 17° C liegen. Lüers (loc. cit. 83) Krauß (loc. cit. 84) sowie Kolbach und Antelmann (100) konnten in neuerer Zeit diese Befunde bestätigen, die übrigens A. Schmidt (101) auch noch im fertigen Bier feststellen konnte. Daß kalt geführte Malze im Vergleich zu wärmer geführten eine bessere Lösung der Eiweißstoffe aufweisen, ist darauf zurückzuführen, daß sie einen höheren Gehalt an Proteasen besitzen. Vom Standpunkt einer Ganzheitsbetrachtung des keimenden Kornes scheinen die Verhältnisse so zu liegen, daß die sich bildende junge Pflanze unter verschiedenen Keimungsbedingungen dieselbe Wachstumsgeschwindigkeit beizubehalten sucht. Da durch warme Haufenführung die Enzymwirkung gefördert wird, werden zum Ausgleich kleinere Enzymmengen gebildet. Daß dieser Ausgleich jedoch kein restloser ist, beweist eben die stärkere Eiweißlösung bei kälterer Führung. Daß es sich bei wärmerer Führung tatsächlich um eine Einschränkung des Eiweißabbaues auch in qualitativer Beziehung handelt, haben Kolbach und Schild (102) durch eine Differenzierung der Stickstoffverbindungen gezeigt. Beim Ansteigen der Führungstemperatur von 13 auf 25° nimmt die Menge des dauernd löslichen Stickstoffs, sowie die des formoltitrierbaren (niedermolekularen) Stickstoffs ab, jene des höher molekularen (mit Ammonsulfat fällbaren) Stickstoffs zu.

Während auf Grund der zahlreichen an praktischen Mälzereiversuchen gewonnenen Erfahrungen heute kein Zweifel mehr darüber besteht, daß für helle Qualitätsmalze vom Pilsner Typ eine kalte langsame Haufenführung auch im Hinblick auf den Eiweißabbau die zweckmäßigste ist, vertreten Lüers und Krauß, sowie Stadler (103) die Ansicht, daß für die Erzielung von typischen dunklen Malzen nach Münchner Art eine wärmere Haufenführung zweckdienlicher ist. Für Münchner Malze bevorzugt man im allgemeinen eiweißreichere Gersten, die sich auch hinsichtlich der Eiweißkörper leichter lösen, wenn sie wärmer geführt werden. Zur Ausbildung

von Farbe und Aroma, was für Münchner Malze unerläßliche Forderung ist, muß ein kräftiger Abbau der Eiweißkörper zu niedrigmolekularen Verbindungen angestrebt werden, da diese als Reaktionspartner bei der Melanoidinreaktion während des Darrens zu fungieren haben. Das Greifenlassen oder gar eine Brennhautführung schafft besonders ausdrücklich die Bedingungen für einen kräftigen Stickstoffabbau, denn durch das Unterbleiben des Wendens steigt die Temperatur im Haufen, gleichzeitig reichert sich Kohlensäure an, sodaß synthetische Aufbauvorgänge im Keimling weitgehend unterbunden werden, jedoch die Enzyme infolge der höheren Temperaturen kräftig weiterwirken. Ein Beispiel, wie diese Verhältnisse den Stickstoffabbau beeinflussen, geben folgende von Fink (loc. cit. 104) ermittelte Werte an einem Brennhautmalz:

	mg in 100 g Malztrockensubstanz				
	Ges. N.	Form. N.	lösl. N.	koag. N	dauernd lösl. N.
Grünmalz					
nach 8täg. Keim.	2029	250	705	177	528
Grünmalz					
nach 8täg. Keim. und 40 Std. Brennhautführung	2111	379	928	151	777

Bezüglich des Einflusses der Zeitdauer der Keimung (bei konstanter Temperatur) wurde bereits weiter oben darauf hingewiesen, daß der Eiweißabbau bereits sehr frühzeitig, meist schon gegen Ende der Weiche kräftig einsetzt, dafür aber etwa am 5. Keimtag zum Stillstand kommt. Dieser Stillstand ist ein scheinbarer, er stellt einen Gleichgewichtszustand zwischen Abbauvorgängen im Endosperm und Aufbauvorgängen im Keimling dar. Besonders deutlich tritt er in Erscheinung, wenn man sich auf die Ermittlung der Menge des dauernd löslichen Stickstoffs beschränkt, die etwa vom 5. Keimtag an praktisch konstant bleibt. Der hochmolekulare Stickstoff nimmt nach Kolbach und Schild (loc. cit. 102) mit weiterer Keimdauer noch etwas zu, während der niedrig molekulare etwas zurückgeht. Auch aus den mehrfach erwähnten Versuchen von Thunnäus und Schröderheim geht hervor, daß der Eiweißabbau — je nach der Sorte in verschiedenen Ausmaße — nach 5—6tägiger Keimung einen charakteristischen Wert erreicht, der bei längerer Keimdauer nicht oder nur mit großer Mühe vergrößert werden kann. Wesentlich leichter gelingt dies, wie kurz zuvor er-

wähnt, durch Greifenlassen unter Temperaturerhöhung, Brennhaufenführung oder besonders auch durch eine 24—36stündige Schwelke. Als Grund für den Stillstand der Eiweißlösungen gegen Ende der Keimung kommt außer des sich einstellenden Gleichgewichts zwischen Abbau- und Aufbauprozessen nach Kolbach's (105) Ansicht auch die Verarmung an abbaufähigem Eiweiß oder mindestens ein Mangel an leicht abbaufähigem Eiweiß im Endosperm in Betracht. Dies ist durchaus möglich, wenn wir uns daran erinnern, daß das Eiweiß des Gerstenkornes in dreierlei Formen, nämlich als Aleuron-Reserve- und histologisches Eiweiß vorliegt, deren Angreifbarkeit für die proteolytischen Enzyme eine sehr unterschiedliche ist. Das Aleuroneiweiß wird nicht oder kaum nennenswert angegriffen, das Reserveeiweiß unterliegt in erster Linie dem Abbau, in zweiter Linie erst das histologische Eiweiß. Ist das Reserveeiweiß abgebaut, so mag damit wohl eine zeitliche Caesur des Eiweißabbaues im allgemeinen eingetreten sein.

Der Einfluß der Reife des Gerstenkornes äußert sich nach Fink und Kunisch (loc. cit. 26) dahingehend, daß eine in der Gelbreife geschnittene Gerste in der Eiweißlösung hinter einer in der Vollreife geschnittenen zurückbleibt. Dies zeigt sich insbesondere in den Hordeingehalten, die mangels genügenden Abbaues in den Malzen aus den früher geschnittenen Gersten höher lagen als in jenen aus Gersten späterer Schnitte. Der Schnitt der Gerste in der Vollreife ist also auch für den Eiweißabbau der zweckmäßigste.

Von besonderer Bedeutung ist der Eiweißgehalt der Gersten auf den Eiweißlösungsgrad, worauf weiter oben schon hingewiesen wurde. Die dem Praktiker aus seiner Erfahrung heraus bekannte Tatsache, daß eiweißreiche Gersten sich schwerer lösen als eiweißärmere hat ja vor einigen Jahrzehnten zu der viel diskutierten „Eiweißfurcht“ geführt, die heute infolge der Fortschritte wissenschaftlicher Erkenntnisse und technischer Erfahrungen im großen Ganzen als überwunden gelten darf. Nichtsdestotrotz aber bleibt die Tatsache bestehen, daß eiweißärmere Gersten qualitativ eine Eiweißzusammensetzung aufweisen, die eine quantitativ weitergehende Lösung gestattet, sodaß eiweißärmere Gersten normalerweise immer mehr lösliches Eiweiß im Verhältnis zum Gesamteiweiß enthalten als eiweißreichere. Dies drückt sich deutlich im Eiweißlösungsgrad aus, der nach Menzel (loc. cit. 95) und Kolbach und Antelmann (loc. cit. 100) durchschnittlich folgende Werte in Abhängigkeit vom Gesamt-Proteingehalt der Trockensubstanz aufweist:

Menzel		Kolbach und Antelmann	
Protein	Eiweißlösungsgrad	Protein	Eiweißlösungsgrad
11—12%	34,8	12,1	unter 35
10—11%	36,6	11,4	35—38
9—10%	37,0	11,3	38—41
		10,9	über 41

Diese Tatsachen gaben schließlich den Anlaß zu der bereits oben erwähnten Kritik, den Eiweißlösungsgrad allgemein als ein Kriterium der Lösung des Malzes heran zu ziehen.

Bezüglich des Einflusses des Weichgrades auf die Eiweißlösung liegen ältere Untersuchungen von Schjerning (loc. cit. 82) vor. Ein niederer Weichgrad (41,7%) hatte in den ersten Keimtagen die beste Eiweißlösung zur Folge, jedoch wurde diese im weiteren Keimverlauf nach 5 Tagen von Gersten mit normalem Weichgrad (46,9%) überholt, während überweichte Gerste (49,6%) in der Eiweißlösung dauernd stark zurückblieb. Unterweichte Gerste keimt rasch an, zeigt aber dann rasches Nachlassen der Lebenstätigkeit. Normal gewechte Gerste keimt langsamer an, hält aber bis zum Schluß ihre Lebensfähigkeit gleichmäßig durch. Überweichte Gerste beginnt erst 4 Tage nach dem Ausweichen mit der Keimung, dann wachsen die lebensfähigen Körner sehr rasch, sodaß die Anzahl der überwachsenen Körner am Schluß größer war als bei der knapp oder normalgewechten Gerste. Hinsichtlich des Eiweißabbaues erweist sich demzufolge eine normale Weiche als die richtige.

Den Einfluß der L ü f t u n g auf den Eiweißabbau verfolgte Schjerning (loc. cit. 82) in allerdings extremer, für die Praxis nicht in Betracht kommender Versuchsanstellung. Er fand folgendes:

10 Tage gewachsen		% der Malztrockensubstanz		
Malz	Wurzel	Atm. Verl.	Malzausb.	Zunahme. d. lösl. N.
				in % des Ges. N.
ungenüg. Lüftung	3,1	3,6	90,1	22,4
normale Lüftung	4,1	5,9	86,8	26,7
überschüss. Lüft.	5,6	6,9	84,3	32,4

Daraus ist ersichtlich, daß die Eiweißlösung in starkem Maße von der Lüftung beeinflußt wird, was nicht verwunderlich ist, da einerseits zur Bildung der Enzyme die Atmung unerläßlich ist, andererseits eine gesteigerte Atmung auch eine Erhöhung des Stoffwechsels im allgemeinen, des Eiweißabbaues im besonderen zur Folge haben muß. Wenn auch, wie man sieht, durch überschüssige Luft-

versorgung der Eiweißabbau stark gesteigert werden kann, so wird er doch durch einen wirtschaftlich nicht tragbaren Mälzungsschwund (Wurzeln, Atmungsverlust) erkaufte. Zu Beginn der Keimung ist auf alle Fälle eine normale Lüftung für den geregelten Ablauf aller Umwandlungsvorgänge, also auch des Eiweißabbaues unerlässlich. Ist die Enzymbildung nach 4—5tägiger Keimung in normaler Weise erfolgt, so kann für die weitere Tätigkeit der Enzyme die Luftversorgung eingeschränkt werden, wie die praktischen Erfahrungen der Kohlensäurerastmälzerei genügend beweisen.

Wie Versuche von Kühles (106), der die Atmung keimender Gerste in der Warburgapparatur verfolgte, zeigten, besitzen eiweißreiche Gersten eine bedeutend größere Atmungsintensität als eiweißnormale Gersten. Als einziges Zahlenbeispiel sei folgendes gebracht: 500 g Grünmalz vom 6. Keimtag verbrauchten in 1^h ccm

Sauerstoff

Malz II	normaler N-Gehalt	47,0
Malz I		37,0
Malz III 15% Protein		
Kalte Führung		95
warme Führung		104,7

Die Hitzigkeit eiweißreicher Gersten kommt in der gewaltig gesteigerten Atmung sinnfällig zum Ausdruck.

Zuletzt sei noch kurz auf die Verteilung der Stickstoffverbindungen im gekeimten Korn und den Entzug von Stickstoff durch die Keime hingewiesen. Dadurch, daß die Keimanlage allein Wachstum zeigt, was mit der Ausbildung neuer Zellen und Gewebe unvermeidlich verbunden ist, müssen Inhaltsstoffe des Endosperms, darunter auch Stickstoffverbindungen in die Keimanlage abwandern. Wenn wir das fertige Malz betrachten, so hat bezüglich des im Malz verbleibenden Blattkeims lediglich eine örtliche Verschiebung des Stickstoffs stattgefunden, während die Wurzelkeime infolge ihrer Entfernung zu einem Verlust an Stickstoffsubstanz Veranlassung geben. Bereits H. Brown (cit. bei Kolbach 105) hat die obwaltenden Verhältnisse quantitativ mit folgendem Ergebnis studiert.

Stickstoffverteilung: Ges. N. der Gerste

	Endosperm	Blattkeim	Wurzeln
ausgeweichte Gerste	86,6	13,4	—
5-Tage-Malz	72,8	18,1	9,1
11-Tage-Malz	51,5	36,3	12,2

Man erkennt aus diesen Zahlen deutlich, wie sich der Stickstoff im Laufe der Keimung vom Endosperm auf Blattkeim und Wurzeln verlagert.

Nach Fink und Kunisch (loc. cit. 26) zeigt der Gesamtstickstoffgehalt der Keimlinge in Prozent ihrer Trockensubstanz im Verlauf des Wachstums eine Abnahme z. B. bei Isariagerste von 6,6 auf 5,1%, bei Hanna von 7,3 auf 4,7%. Das bedeutet also, daß die während der Keimung von der Keimanlage gebildeten neuen Gewebe stickstoffärmer sind, als sie es in der ungekeimten Gerste waren. Trotzdem aber ist natürlich infolge der Gewichtsvermehrung des Keimlings während der Keimung die absolute Menge des in die Keimanlage eingewanderten Stickstoffs beträchtlich, wie bereits obige Werte von Brown zeigen. Nach Fink und Kunisch entfallen vom gesamten Stickstoff des geweichten Kornes 16% auf die Keimanlage, nach 8tägiger Keimung dagegen 40—42%, sodaß während der Keimung ein sehr bedeutender Entzug von Stickstoff aus dem Korn stattfindet. Außer diesen quantitativen Veränderungen sind aber auch qualitative feststellbar. Am Anfang der Keimung besteht der in die Keimanlage eingewanderte Stickstoff zum größten Teil aus salzlöslichem Stickstoff, mit zunehmender Keimdauer (etwa vom 4.—5. Tag) findet dann im Keimling ein Aufbau von Glutelin statt, wobei dieser Aufbau sowohl hinter der Lösung des Glutelins im Mehlkörper als auch der Blattkeimentwicklung zeitlich zurückbleibt. Von dem beim Maischen aus dem Malz in Lösung gehenden dauernd löslichen Stickstoff stammt nahezu die Hälfte aus dem Blattkeim. Trotz seines geringen Gewichtsanteils ist also der Blattkeim der Lieferant fast der Hälfte des dauernd löslichen Stickstoffs der Würze (Kolbach loc. cit. 105).

Dies veranschaulichen auch Untersuchungen von Dickson (106) aus neuester Zeit, in welchen die Löslichkeit der Stickstoffverbindungen getrennt nach Spitzen- und Keimhälfte bestimmt wurde.

		Gerste	2.	6.	9-Tg.-Malz
Kaltwasserlösl. N.	Spitzenhälfte	7,4	12,6	14,2	20,3
in % des Ges.-N.	Keimhälfte	12,2	22,9	38,0	36,5

Eine Untersuchung des Eiweißgehaltes der Wurzeln seitens Kolbach und Antelmanns (107) ergab einen dauernden Verlust der Wurzeltrockensubstanz an Protein während der Keimung. Am 2. Tag betrug z. B. der Proteingehalt der Wurzeln 39,0%, am 8. Keimtag nur noch 29,2%. Es zeigen sich also ähnliche Verhältnisse, wie sie oben von Fink und Kunisch an der Keimanlage beobachtet wurden. Im Mittel gehen durchschnittlich 11% des Gersteneiweißes

in die Wurzelkeime über, sodaß man von Gerste zu Malz mit einem Eiweißverlust von annähernd 0,3 g auf 100 g Trockensubstanz rechnen kann. Kräftiges Wurzelkeimwachstum ist also ein Mittel, der Gerste Eiweiß zu entziehen, wobei allerdings ein erhöhter Schwund hingenommen werden muß.

c Das Darren.

Beim Darren des Grünmalzes auf der oberen und unteren Horde finden bekanntlich mehrere sich überlagernde Vorgänge statt. Bei niederen Temperaturen und hohem Wassergehalt beobachtet man noch eine Fortdauer von Lebensprozessen, die sich in Wachstum und Enzymwirkung äußern. Letztere hält auch bei höheren Temperaturen, bei welchen das Wachstum erloschen ist, noch an. Beim Ausdarren treten dann die Wirkungen höherer Temperaturen in Form von Koagulation von Proteinen und der Farb- und Aromabildung in Erscheinung. Da die Darrführung je nach dem anzustrebenden Malztyp eine sehr verschiedene ist, werden sich auch die genannten Prozesse unterschiedlich auswirken.

1. Veränderungen der Stickstoffverbindungen beim Darren.

Bereits Barth und Dinklage (108) stellten beim Darren von dunklem Malz eine starke Zunahme des löslichen und koagulierbaren Stickstoffs auf der oberen Horde, dagegen eine Abnahme auf der unteren Horde fest. Untersuchungen Schjernings (loc. cit. 82) sind für unsere Zwecke nicht eindeutig auswertbar, weil er die Stickstoffverhältnisse in Würze analysierte, sodaß sich die enzymatischen Vorgänge beim Maischen den Veränderungen beim Darren überlagerten. Lüers und Nishimura (109) verfolgten die Veränderungen von Gesamt-löslichem, koagulierbaren und formoltitrierbaren Stickstoffs in den einzelnen Darrphasen bei hellen und dunklen Malz mit folgendem Ergebnis:

		Helles Malz A.					
Probe	I	1,715	0,494	0,138	27,9	28,8	0,237
„	II	1,722	0,485	0,124	25,6	28,2	0,240
„	III	1,718	0,485	0,119	24,6	28,2	0,231
„	IV	1,717	0,482	0,111	23,0	28,1	0,220

Helles Malz B.

Probe	I	1,708	0,510	0,144	28,2	29,5	0,171
„	II	1,725	0,511	0,141	27,6	29,6	0,163
„	III	1,716	0,509	0,140	27,5	29,6	0,163
„	IV	1,700	0,505	0,134	26,5	29,7	0,153

Dunkles Malz C.

Probe	I	1,651	0,506	0,108	21,4	30,7	0,145
„	II	1,668	0,523	0,144	27,5	31,4	0,148
„	III	1,661	0,518	0,142	27,4	31,2	0,145
„	IV	1,775	0,520	0,136	26,2	32,0	0,145
„	V	1,712	0,396	0,068	17,2	23,0	0,116

Helles Malz

dunkles Malz

Probe	I	obere Horde b. Auftrag.	obere Horde b. Auftrag.
„	II	untere Horde b. Auftrag.	ob. Horde vor Temp. steig.
„	III	unt. Horde vor Temp. steig.	unt. Horde b. Auftrag
„	IV	unt. Horde b. Abräumen	unt. Horde vor Temp. steig
„	V	—	unt. Horde b. Abräumen

Aus diesen Befunden geht zunächst einmal ein sehr starker Unterschied zwischen dem hellen und dem dunklen Malz hervor. Bei den hellen Malzen sind die Veränderungen des löslichen, koagulierbaren und formolitrierbaren Stickstoffes nur unbedeutend. Der Wassergehalt des Kornes wird hier so rasch erniedrigt, daß weder das Wachstum des Kornes noch die Tätigkeit der Enzyme Gelegenheit finden, die Stickstoffverhältnisse nennenswert zu beeinflussen. Auch wirkt die verhältnismäßig niedere Abdarrtemperatur verbunden mit niederem Wassergehalt, selbst in der Endphase des Darrprozesse kaum noch ein, denn die Werte für löslichen und koagulierbaren Stickstoff fallen nur geringfügig ab.

Bei den dunklen Malzen dagegen erfolgt einerseits noch ein bemerkenswertes Wachstum, andererseits bei dem länger anhaltenden, höheren Wassergehalt eine erhebliche enzymatische Tätigkeit. Sie äußert sich in einer kräftigen Zunahme des löslichen und koagulierbaren Stickstoffes in dem ersten Stadium des Darrens auf der oberen Horde. Während des Abdarrens findet dann infolge der hohen Temperatur eine starke Koagulation von Eiweiß statt, die die

Werte für koagulierbaren und löslichen Stickstoff stark herunderdrückt. Aber auch der formoltitrierbare Stickstoff, der sich bei den hellen Malzen kaum verändert, erleidet hier eine recht beträchtliche Abnahme, die daher rührt, daß er unter Farbe- und Aromabildung beim Darren verbraucht wird.

Während die Versuche von Lüers und Nishimura die beim Darren in der Praxis obwaltenden Verhältnisse beleuchten, haben Kolbach und Schild (110) durch Modellversuche mit Malzen von festgelegtem Wassergehalt und definierten Temperaturen klare Vorstellungen zu gewinnen versucht.

Die Autoren weisen zunächst darauf hin, daß der gesamtlösliche Stickstoff zur Beurteilung der proteolytischen Vorgänge beim Darren nicht brauchbar ist, weil bereits bei verhältnismäßig niedriger Temperatur (50° und sogar darunter) nennenswerte Koagulation der Eiweißkörper eintritt, welche die Stickstoffverhältnisse verschleiert. Allein der dauernd lösliche Stickstoff stellt ein geeignetes Maß dar. Bei einem Wassergehalt des Malzes von 43,6% liegt das Temperaturoptimum für die Bildung von dauernd löslichem Stickstoff und damit für die Proteinasewirkung bei 56—58°, bei einem Wassergehalt von 23,2% bei 62—66° und bei einem Wassergehalt von 15% bei 66—70°. Mit sinkendem Wassergehalt tritt also eine Verschiebung der Proteinasewirkung nach höheren Temperaturen ein, weil mit sinkendem Wassergehalt die Hitzeinaktivierung der Enzyme verzögert wird. Was den Umfang der Eiweißlösung in Abhängigkeit vom Wassergehalt anbelangt, so gelten ungefähr die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie beim Stärkeabbau. Ein Absinken des Wassergehaltes von 43 auf 34% hat keine nennenswerte Abnahme des Eiweißabbaues zur Folge, dagegen bedingt eine Senkung des Wassergehaltes auf 24% eine sehr starke Senkung des Eiweißabbaues. Ein Unterschied zwischen Stärke- und Eiweißabbau besteht darin, daß der Stärkeabbau im Vergleich zum Maischen beim Darren unbedeutend ist, während der Eiweißabbau unter günstigen Bedingungen (siehe Caramelmalze „Maischen in ganzen Korn“) an jenen beim Maischen von Malzmehl herankommt. Ein weiterer Unterschied ist der, daß bei einem Wassergehalt des Malzes von 15% der Stärkeabbau gleich Null, der Eiweißabbau jedoch noch beträchtlich ist. Ein Grünmalz besaß z. B. 18,7% des Gesamt-N. als dauernd löslichen Stickstoff. Nach 8stündigem Darren bei 60° und konstantem Wassergehalt wies das Malz nun einen dauernd löslichen Stickstoff von 34,8% auf, es war also während des 8stündigen Darrens mehr Eiweiß gelöst worden als in etwa 8 Tagen bei 14—20° auf der

Tenne, denn vom Gesamt-Stickstoff der Gerste sind etwa 8—9%, von dem des Grünmalzes etwa 18,7% dauernd löslich. Für die Praxis haben diese Feststellungen im Allgemeinen keine größere Bedeutung, nur für Caramel- und Brühmalze kommen sie in Betracht. Bei den hellen Malzen unterbindet man durch kräftiges Vortrocknen bei niederen Temperaturen einen weiteren Eiweißabbau, da man andernfalls das Ziel einer kalten Haufenführung illusorisch machen würde. Die Grenztemperaturen, bei welchen bei 8stündigem Darren keine nennenswerte Vermehrung des dauernd löslichen Stickstoffs mehr zu befürchten ist, sind folgende:

bei einem Wassergehalt von 43%	Grenztemperatur 23°
" " " " 34%	" 26°
" " " " 24%	" 40°
" " " " 15%	" 50°

Ein Teil des dauernd löslichen Stickstoffs ist formoltitrierbar. Da die Peptidasen hitzeempfindlicher sind als die Proteinase, ist zu erwarten, daß die optimale Temperatur für die Bildung des Formol-Stickstoffs niedriger liegt als jene für die Bildung von dauernd löslichem Stickstoff, was auch tatsächlich der Fall ist, wie folgende Übersicht zeigt:

Wassergehalt	Temp. opt. f. Bild. d. l. N.	Temp. opt. f. Bild. Form. N.
43%	56—58°	51—55°
34%	höher als 60°	53—57°
24%	62—66°	59—63°
15%	66—70°	unscharf

Beim Darren wirken also die Peptidasen an der Proteolyse mit. Dafür kann als Beweis die Tatsache gelten, daß bei niederen Darretemperaturen der Anteil des Formol-N am dauernd löslichen Stickstoff ein höherer ist, als dies bei höheren Temperaturen der Fall ist. Von 100 mg dauernd löslichen Stickstoff, die beim Darren als Zunahme in Erscheinung treten, sind bei 30° rund 66% und bei 60° rund 41% formoltitrierbar. Beim Maischen findet man ähnliche Verhältnisse. Die Ursache ist wie gesagt darin zu suchen, daß die Peptidasen bereits bei niedrigeren Temperaturen geschädigt werden als die Proteinase, infolge dessen verläuft die Proteolyse bei höheren Darretemperaturen qualitativ verschieden von jener auf der Tenne (23).

Der koagulierbare Stickstoff weist bei einem Malzwassergehalt von 43% bei 8stündigem Darren und einer Temperatur von 40° bereits einen etwas niedrigeren Wert als der nicht gedarrte Vergleichs-

versuch auf. Bei einer Temperatur von 30° dagegen werden praktisch die gleichen Werte wie beim Nullversuch erhalten. Bei einer der oberen Horde etwa entsprechenden Temperatur von 50° wirkt sich 8stündiges Darren bei verschiedenen Wassergehalten folgendermaßen aus:

Wassergehalt	41,9	33,5	23,2	15,0
Restgehalt an koag. N.	108	117	150	164 mg

Das heißt, daß die Koagulation der Eiweißkörper bei konstanter Temperatur und Zeit mit fallendem Wassergehalt des Malzes erheblich abnimmt.

Besonders stark wirken sich natürlich die eigentlichen Abdarrtemperaturen auf den koagulierbaren Stickstoff aus. Bei einem Wassergehalt von 11,5%, was etwa demjenigen des dunklen Malzes vor der Temperatursteigerung auf der unteren Horde entspricht, tritt bei 60° bereits ein Verlust von rund 25% des koagulierbaren Stickstoffs ein, bei 90° dagegen sind von ursprünglich 200 mg nur noch 35 mg Stickstoff in koagulierbarer Form vorhanden. Beträgt dagegen der Wassergehalt des Malzes nur 5,2%, was etwa den Verhältnissen bei Beginn des Ausdarrrens von hellem Malz entspricht, so ändert sich bei 60° der koagulierbare Stickstoff praktisch nicht, während bei 90° von 199 mg noch 136 vorhanden waren. Da somit der Gehalt eines Malzes an koagulierbarem Stickstoff sehr stark von den in der Praxis sehr schwer genau festzulegenden Wassergehaltes- und Temperaturverhältnissen beeinflusst wird, dürfte der Versuch, den koagulierbaren Stickstoff eines Malzes zur Bestimmung der Ausdarrtemperatur heranzuziehen, wenig aussichtsreich sein.

2. Die Melanoidinreaktion.

Bereits im vorangehenden Abschnitt mußte auf die in der Abdarrphase von statten gehende Melanoidinreaktion Bezug genommen werden. Was die ältere und neuere Literatur über die Melanoidine anbelangt, sei auf zusammenfassende Darstellungen von Lüers (113) und Enders (114) verwiesen. Man versteht unter Melanoidinen die braunen Farbstoffe, welche beim Darren des Malzes, beim Backen des Brotes, beim Erhitzen von Kohlehydrat und Stickstoff enthaltenden Lösungen z. B. Zuckerrübensäften entstehen.

Die Melanoidinreaktion kommt dadurch zustande, daß Zucker mit freier Carbonylgruppe mit Aminosäuren oder auch niederen Eiweißabbauprodukten mit freien Aminogruppen unter Bildung brauner Kondensationsprodukte reagieren. Dabei verschwindet die Car-

bonylgruppe der Zucker, nachweisbar durch das Reduktionsvermögen, und die Aminogruppe, nachweisbar z. B. durch die Formoltitration. Die Aminosäuren werden dabei unter Bildung des entsprechenden Aldehydes, Ammoniaks und Kohlensäure oxydiert. Der Ammoniak tritt mit den Zuckern unter Bildung heterocyclischer, in ihrer Konstitution noch nicht völlig aufgeklärter Ringsysteme zusammen. Die höheren Aldehyde sind für das je nach den einzelnen Aminosäuren verschiedenartig auftretende Aroma verantwortlich zu machen. Glycocoll und Alanin führen zu einem an Biercouleur erinnernden Aroma. Phenylalanin liefert ein welkenden Rosen ähnelndes Aroma, während Valin zur Bildung eines feinen Röstaromas, Leucin zu intensivem Röstaroma Veranlassung gibt. Ammoniak, Methylamin, Trimethylamin und Cholin liefern einen brenzlichen Geruch und bitteren Geschmack. Für das Zustandekommen der Melanoidinreaktion sind ein gewisser Wassergehalt und höhere Temperaturen erforderlich.

Je höher die Temperatur bei gegebenem Wassergehalt ist, desto rascher und intensiver verläuft die Farbe- und Aromabildung.

Daß während der Melanoidinreaktion die Aminogruppe verbraucht wird, stellten außer Ruckdeschel (cit. bei 113 und 114), Lüers und Nishimura (109) fest, die auch gleichzeitig den Nachweis erbrachten, daß in der Abdarrphase Kohlensäure vom Malz abgegeben wird. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt ausgeführt wurde, konnten Lüers, Stricker und Schild (112) an einigen kolorimetrisch exakt bestimmbaren Aminosäuren nachweisen, daß diese in der Ausdarrphase unter Bildung von Melanoidinen mehr oder weniger stark verbraucht werden.

Bei der Darrweise der dunklen Malze, bei welchen hohe Temperaturen bei verhältnismäßig hohem Wassergehalt zur Wirkung kommen, sind die Voraussetzungen zum Eintreten der Melanoidinreaktion besonders gegeben, zumal bereits die Führung der Grünmalze auf der Tenne auf die Ausbildung eines kräftigen Abbaues der Korninhaltsstoffe abzielte und dementsprechend für höhere Gehalte an Zuckern und Aminosäuren sorgte. Unsachgemäß geführte Kohlensäurerastmalze mit einem infolge autolytischer Vorgänge besonders hohen Gehalt an Zuckern und Aminosäuren neigen, wie bekannt, zum Farbefangen auf der Darre. Bei den knapper geführten hellen Malzen ist der Abbau ein geringerer, außerdem werden sie bei niederem Wassergehalt schonender abgedarrt, sodaß hier die Bedingungen für das Eintreten der Melanoidinreaktion ungünstiger sind und demgemäß helle Farben resultieren.

Über sonstige Eigenschaften der Melanoidine und ihre Bedeutung für das Bier finden sich nähere Angaben bei den unter (113 und 114) zitierten Veröffentlichungen.

Wie Enders nachweisen konnte, verläuft die Melanoidinreaktion von seiten der Zucker über eine sehr reaktionsfähige C_3 -Verbindung, einer Triose X, die mit den Zuckern in Gleichgewicht steht. Diese Verbindung stabilisiert sich zu Methylglyoxal. Schwefeln des Malzes beim Darren hat bekanntlich sehr helle Farben zur Folge, was darauf beruht, daß die schweflige Säure die Aldehydgruppe des Methylglyoxals blockiert und damit an der Kondensation mit Aminosäuren hindert.

Neben den Melanoidinen entsteht nach Versuchen von Enders aus Methylglyoxal und Ammoniak in geringer Menge auch β -Alanin, $CH_2NH_2-CH_2-COOH$, ein sehr wirksamer Wuchsstoff für Mikroorganismen.

Eine neuere technische Maßnahme, welche ihrem Wesen nach in dieses Kapitel gehört, stellt das Aromatisieren des Malzschrötes dar. Es wird derart durchgeführt, daß Malzschrot auf einem Spezialapparat (Aromatiseur) von Ziemann 10—20 Minuten auf eine Temperatur von etwa 130° erhitzt wird. Das aromatisierte Malzschrot hat im Verschnitt von ca. 20% mit normalen Malz verbraut, ein kräftiges Aroma, erhöhte Schaumhaltigkeit, Vollmundigkeit und Süffigkeit des Bieres zur Folge. Daß hier in kurzer Zeit erreicht wird, was beim ganzen Korn erst in Stunden möglich ist, muß auf die geänderten Reaktionsbedingungen des Schrötes gegenüber dem ganzen Korn zurückgeführt werden. Mit den chemischen Veränderungen während des Aromatisierens beschäftigt sich eingehend G. Novak (115), aus dessen Untersuchungen hervorgeht, daß diese im Wesentlichen in ähnlicher Weise wie beim Darren verlaufen, also Enzymschwächungen, Veränderungen in der Stickstoffgruppe und das Eintreten der Melanoidinreaktion betreffen. Einen kurzen Auszug aus den analytischen Befunden Novak's bringt folgende Tabelle:

		aromatisiert bei 130°			
		Original	5	10	15 Min.
Wassergehalt		5,0	3,2	2,2	1,5
Farbe		0,19—0,21	0,22—0,24	0,35—0,40	0,45—0,50
löslicher N.	} in % des G.-N.	32,1	29,6	25,7	24,7
koagul. N.		8,9	6,4	5,4	4,4
dauernd lösl. N.		23,2	20,7	20,3	20,4
Ges.-Würze N.		35,3	33,1	30,6	28,7
Formol-N.		11,0	9,8	8,0	5,9

Farbzunahme und Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffs deuten darauf hin, daß während des Aromatisierens auch die Melanoidinreaktion in einem gewissen Umfang von statten geht.

3. Proteolytische Enzyme, Dispersitätsgrad der Proteine und Abdarrungsgrad.

Die Veränderungen, welche die proteolytischen Enzyme während des Darrens erfahren, wurden von Lüers und Nishumura (l. c. 109) untersucht. Auch wurde bereits anlässlich der Besprechung der Veränderungen der Stickstoffverbindungen beim Darren, welche von Kolbach und Schild (l. c. 110) an Modellversuchen studiert wurden, darauf hingewiesen, daß mit den N-Verbindungen auch die Proteasen wie alle anderen Enzyme beim Darren mehr oder minder erhebliche Veränderungen erfahren. Die beiden Komponenten, nämlich die Proteinase und die Peptidasen erweisen sich als verschieden resistent gegen höhere Temperaturen und zwar besitzt die Proteinase eine größere Temperaturbeständigkeit als die Peptidasen.

Während des Darrens treten an den Kolloiden des Malzes Dispersitätsveränderungen ein, die sich z. B. in einer mit Darretemperatur und Abdarrzeit zunehmenden Opaleszenz der Laboratoriumswürze kund geben. Sie werden von Veränderungen der Dispersität verschiedener Stoffklassen wie Kohlehydrate (Pentosane der Spelze) und Eiweißstoffen bedingt und sind oft ziemlich sortenausgeprägt.

Einen unmittelbaren Nachweis dafür, daß beim Darren eine Dispersitätsgradsvergrößerung erfolgt, haben an der Stickstoffgruppe Windisch, Kolbach und Wentzel (116) erbracht, indem sie Gersten-Grünmalz- und Darrmalzauszüge durch Kollodiumultrafilter verschiedener Porenweite filterten.

Je konzentrierter die verwendete Eisessig-Kollodiumlösung ist, desto dichter ist das Filter und desto höher dispers sind die Stickstoffverbindungen, welche das Ultrafilter passieren. Folgende Tabelle bringt einen Auszug aus den Versuchsergebnissen:

Art des Stickstoffs	Gerste	Grünmalz	Darrmalz
Löslicher N.	140	104	114
dauernd lösl. N.	100	100	100
N. im 1½%igen Ultrafiltrat	90	91	98
„ 3 % „ „	73	83	98
„ 4½% „ „	64	72	67
„ 6 % „ „	39	68	63
„ 7 % „ „	27	58	60

Während der Keimung findet somit eine relative Zunahme der höher dispersen, in diesem Falle gleichzeitig niedriger molekularen Stickstoffverbindungen statt. Beim Darren dagegen erfährt der Dispersitätsgrad, in welchem der lösliche Stickstoff auftritt, eine Vergrößerung, da die Anteile, welche die am wenigsten dichten Ultrafilter passieren ($1\frac{1}{2}$ und 3%ig) deutlich zunehmen.

Ausdarrungsgrad.

Es war naheliegend, daß man im Laufe der Zeit immer wieder nach analytischen Methoden suchte, welche eine Beurteilung speziell der Darrarbeit gestatten. Es ist hier nicht der Ort, sich im Einzelnen mit diesem Gebiete zu beschäftigen und es mag genügen auf die mit diesem Gebiet in letzter Zeit sich beschäftigende Literatur hinzuweisen, nämlich Kolbach (117) und Enders und Wieninger (118). Unter den verschiedentlichen Vorschlägen von analytischen Verfahren zur Kontrolle des Ausdarrungsgrades befindet sich auch der, die Koagulation der Eiweißkörper hiefür heran zu ziehen. Wie Kolbach und Schild (l. c. 110) in ihrem mehrfach erwähnten Darrstudien feststellen konnten, wird die Koagulation der Eiweißkörper in so erheblichem Ausmaße von der Höhe des Wassergehaltes zu Beginn der Ausdarrphase beeinflusst, daß die Aussichten, den Restgehalt an koagulierbarem Eiweiß als Kennzeichen der Ausdarrtemperatur heran zu ziehen, ziemlich gering werden. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß auch die vor dem Ausdarren obwaltenden Darrbedingungen besonders bei dunklen Malzen, ja sogar die Art der Tennenführung (ob kalt oder warm) die Höhe des koagulierbaren Stickstoffes in schwer zu überblickender Weise alterieren können.

4. Malzkeime.

Die während des Keimens der Gerste sich bildenden Wurzelkeime werden zum Teil während des Darrens (Saukeime) oder zum Teil beim Putzen des fertigen Malzes (Putzmaschinenkeime) entfernt. Die Zusammensetzung der Malzkeime wurde verschiedentlich analytisch ermittelt. Als Beispiel neuerer Analysen sind in folgender Tabelle die Befunde von A. Baumann (119) wiedergegeben.

	Münchener Malz		helles Malz	
	Darrkeime	Putzmasch.- Keime	normales helles Malz	Sehr kurz gew. Malz
Wasser	7,03	7,73	8,80	10,07
Rohprotein	30,88	25,31	30,06	34,18
Fett	1,63	1,82	1,95	2,23
Rohfaser	9,64	11,86	8,64	11,42
Asche	6,95	6,11	6,02	7,05
Stickstoffr. Extraktst.	43,87	47,17	44,53	35,15

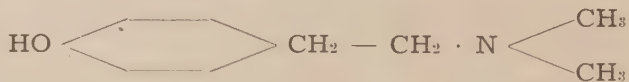
Der hohe Rohproteingehalt macht sie zu einem wertvollen und geschätzten Futtermittel. Er wird durch einen hohen Gehalt an gut verdaulichen Kohlehydraten und einem reichlichen Mineralstoffgehalt ergänzt, unter dem quantitativ die Phosphate hervorragen. Wie bereits vorstehende Tabelle erkennen läßt, ist der Eiweißgehalt von kurz gewachsenen Malzkeimen bedeutend höher als jener von normal oder langgewachsenen Keimlingen. Nach Kolbach und Antelmann (120) nimmt der Eiweißgehalt der Wurzelkeimtrockensubstanz im Verlauf der Keimung stetig ab z. B. von 39,0% am 2. Keimtag auf 29,2% am 8. Keimtag. Das bedeutet, worauf früher schon einmal hingewiesen wurde, daß im Laufe der Keimung sich der Zuwachs an Keimtrockensubstanz zugunsten der Nichteiweißstoffe verschiebt. Der hohe Stickstoffgehalt der Malzkeime beweist ferner, daß durch das Wachstum der Wurzelkeime dem Korn Stickstoff entzogen wird. Man kann im Durchschnitt mit einer Abwanderung von 11% des Gersteneiweißes in die Keime rechnen, wodurch sich ein Unterschied von etwa 0,3% zwischen dem Eiweißgehalt der Gersten- und Malztrockensubstanz ergibt. Kräftiges Wurzelkeimwachstum ist deshalb ein Mittel, den Eiweißgehalt des Malzes in gewissen Grenzen zu erniedrigen, womit allerdings ein erhöhter Schwund hingenommen werden muß.

Baumann untersuchte die Malzkeime auch auf ihre besonderen Bestandteile und fand dabei folgendes:

In der Trockensubstanz sind enthalten:	dunkle	helle Keime
Rein-Eiweiß-Stickstoff	416	3,46
Löslicher Stickstoff	1,51	1,13
N-freie Extraktstoffe	27,64	31,73
Pentosane	15,62	18,93
Saccharose	3,82	7,65
Löslicher Extrakt mit Malzauszug	37,91	38,40
Löslicher Extrakt ohne Malzauszug	36,36	36,06

Darnach beläuft sich der Reineiweißgehalt auf etwa 70—80% des analytisch aus dem Stickstoffgehalt ermittelten Rohproteins, während der lösliche Stickstoff etwa 20—30% des Gesamtstickstoffs ausmacht. Jalowetz (121) fand in den von ihm untersuchten Keimen 40—50% des Gesamteiweißes in löslicher Form. Da im Laufe der Keimung der Stickstoff nur in löslicher Form aus dem Endosperm in die Keimanlage einwandern kann, hat, wie wir schon bei Erörterung des Keimungsprozesses sahen, in den Keimen ein Aufbau zu unlöslichen Proteinen stattgefunden, die zum Teil in Salzlösungen (Edestin), zum Teil in Natronlauge (Glutelin) löslich sind, während das Hordein nur ausnahmsweise in geringer Menge in den Keimen zu finden ist.

Der hohe formoltitrierbare Stickstoffgehalt der Malzkeime (ca. 30% des löslichen N) deutet darauf hin, daß niedermolekulare Stickstoffverbindungen in Form von Aminosäuren, Peptiden, Säureamiden u. a. in erheblicher Menge vorliegen müssen. Brown und Millar (122), Hashitani (123) und Joshimura (124) wiesen Asparagin, Allantoin, Betain, Cholin und Adenin nach. Außerdem kommt in den Malzkeimen regelmäßig das Alkaloid Hordenin vor, das nach



seiner Konstitution ein p — oxyphenyl — dimethyl — aethylamin ist. Es ist durch stark bitteren Geschmack ausgezeichnet und findet in der Tierheilkunde gegen Durchfall und Ruhr in Form des Sulfates Verwendung. Der Höchstgehalt mit 0,4—0,5% der Keimlingstrockensubstanz wird etwa am 4. Keimtag erreicht, nach 25tägiger Keimdauer ist es wieder verschwunden. Seine Synthese erfolgt nach Raoul (125) aus Tyrosin, das zu Tyramin decarboxyliert und mit Formoldehyd zum Hordenin methyliert wird. Möglicherweise dürfte auch im Pflanzenorganismus seine Bildung auf ähnlichem Wege verlaufen. Der bittere, schwer selektiv zu entfernende Geschmack erschwert außerordentlich die Verwertung der an sich sonst gut geeigneten Malzkeime für die Zwecke der menschlichen Ernährung.

d) Spezialmalze.

Nebelmalze. Seit Bekanntwerden des DRP 507 983 von W. Wolfrum hat man sich in den Jahren 1932 bis in den letzten Krieg hinein eingehend mit den Nebelmalzen beschäftigt, deren Herstel-

lungsprinzip darauf beruht, daß das Keimgut zwischen 36 und 48 Stunden nach dem Ausweichen mit einer sehr verdünnten Salpetersäurelösung oder neuerdings mit Sladrollösung d.i. salpetersaurem Harnstoff benebelt wird. Es liegt nahe in dieser Maßnahme eine Art künstlicher Düngung mit einer assimilierbaren Stickstoffsubstanz zu sehen, die zu einer Einsparung von Kornstickstoff führt. Im Falle des salpetersauren Harnstoffes mag diese Auffassung auch zu Recht bestehen, doch hat sich gezeigt, daß der Effekt der Benebelung in einer Schädigung des Wurzelkeimwachstums durch die Salpetersäure oder die aus dem salpetersaurem Harnstoff nach Verzehr des Harnstoffes frei werdende Salpetersäure begründet ist. Infolge der Verätzung der Wurzeln scheint auch die Kornatmung verringert zu werden, ohne daß die Enzymtätigkeit nennenswert beeinflußt wird. Der Schwand ist geringer, die Lösung bei knappem Gewächs besser, die Verzuckerung rascher, die Säure höher, der lösliche Stickstoff niedriger als bei normalen Vergleichsmalzen. Die Urteile über Nebelmalze sind im allgemeinen nicht ungünstig, doch wird verschiedentlich die Berechtigung ihrer Herstellung in Frage gestellt, da sich das gleiche Ziel auch auf anderen, gebräuchlicheren Wegen erzielen läßt.

Caramelmalze. Eine systematische Untersuchung der bei der Caramelmalzbereitung vonstatten gehenden Vorgänge im Korn stammt von Kolbach und Schild (128). Hinsichtlich des Eiweißabbaues beobachtet man eine breite optimale Zone von 60 bis 75° für die Bildung von dauernd löslichem Stickstoff. Der Formolstickstoff zeigt die auch beim Maischen gewonnene Gesetzmäßigkeit, daß bei höheren Temperaturen verhältnismäßig weniger Formol-N entsteht. Der Eiweißabbau erreicht bei der Verzuckerung im Korn der Größenordnung nach den Umfang wie beim Maischen. Es besteht also zwischen Eiweißabbau und Stärkeabbau ein erheblicher Unterschied, der vielleicht damit zu erklären ist, daß das Eiweiß als Substrat der Proteasen in wesentlich niederer Konzentration vorliegt als die Stärke.

Melanoidinmalze.

Wie ihr Name sagt, sind die in letzter Zeit aufgekommenen Spezialmalze dadurch ausgezeichnet, daß bei ihrer Herstellung die Bedingungen für das Eintreten der Melanoidinreaktion besonders geschaffen wurden. Wenn auch im einzelnen über die technologischen Ver-

fahren nichts Näheres bisher bekannt geworden ist, so kann man auf Grund der Analyse dieses Malztyps sich doch eine Vorstellung von dem zu ihrer Herstellung eingeschlagenen Wegen machen. Für das Eintreten der Melanoidinbildung ist ein weitgehender Abbau der Kohlehydrate und Eiweißkörper, also eine besonders kräftige Lösung der Malze erforderlich. Bei der meist sehr hohen Ausbeute, die die Melanoidinmalze besitzen, ist diese Lösung wohl in erster Linie durch eine kalte, lange Mälzung mit anschließender Brennhaufenführung erreicht, wobei die hohe Temperatur die Lösung stark befördert, die dabei stattfindende Kohlensäurerast den Schwund vermindert. Die Farben dieser Malze liegen meist zwischen 5 und 10, manchmal auch noch etwas höher, auch ist ihr Säuregrad bedeutend höher als der normaler dunkler Malze. Melanoidinmalze werden meist im Verschnitt mit anderen Malzen vermaischt und verleihen der Würze eine satte Farbe und ein kräftiges Aroma. Es ist kein Zweifel, daß damit ein ansprechenderes Bier sich erzielen läßt als durch Farbmaltzzusatz, da die Melanoidinmalze nicht die brenzliche Bittere der Farbmalze besitzen.

Farbmaltz.

Beim Farbmaltzbrennen mit den dabei obwaltenden hohen Temperaturen treten Reaktionen auf, welche von der beim Darren erfolgenden Melanoidinreaktion sich durch Art und Ausmaß des Verlaufes unterscheiden. Eine Erkenntnis neuerer Zeit von allgemeiner Bedeutung ist die, daß beim Rösten vegetabilischer Produkte Röststoffe entstehen, welche eine physiologische, einwandfrei feststellbare Wirkung auf Magen und Darm auszuüben vermögen. Diese Wirkung scheint auf das Auftreten von Histamin und Histobasen beim Röstprozeß zurückzuführen zu sein, deren Menge in ursächlichem Zusammenhang mit dem Eiweißgehalt des Ausgangsmaterials steht. In neuester Zeit haben nun Bleyer, Diemair, Fischler und Täufel (127) das Problem neu aufgegriffen und einerseits mit chemischen Methoden das Auftreten von Histobasen, (Histamin, Histidin) beim Rösten verschiedener Vegetabilien verfolgt, andererseits mit Hilfe des Kymographions die physiologischen Wirkungen von Infusen aus Röstprodukten am überlebenden Meerschweinchendarm studiert.

Obleich nach neuen unveröffentlichten Versuchen von Enders der chemische Nachweis der Histobasen durch Kupplung mit Diazoniumverbindungen nicht spezifisch ist und daher die nach der chemischen

Methode erhaltenen Ergebnisse nur mit Vorbehalt zu werten sind, sei ein Auszug aus den Resultaten Bleyers und Mitarbeitern im folgenden gebracht:

mg Histobasen in 100 g Röstgut
Rösttemperatur

Ausgangsmat.	Ungeröstet	100°	125°	150°	175°	200°	225°	250°
Kartoffel	34	34	40	46	76	53	34	—
Cichorie	50	—	58	66	36	28	10	—
Gerste	60	62	68	69	69	62	90	18
Kaffee	86	—	86	120	84	44	54	18
Weizen	100	—	—	130	88	146	120	26

Daraus ist ersichtlich, daß mit steigender Rösttemperatur im allgemeinen der Histobasengehalt bis zu einem Maximum zunimmt, um dann rasch wieder abzufallen. Bei der Gerste findet zwischen 150° und 225° etwa gleichmäßig die Bildung der Histobasen statt. Mit Hilfe der physiologischen Methode (Kymographion) ließ sich zeigen, daß die aus der Darmerregbarkeit ermittelten Histobasenwerte in befriedigender Weise den kolorimetrisch bestimmten parallel gingen.

c) Lagerung des Malzes.

Frisch von der Darre kommendes Malz läßt sich schwer verbrauen, es soll einige Wochen lagern, wobei es seinen Eigenschaften zuträgliche kolloidchemische Veränderungen durchmacht, die bei sehr langer Lagerung besonders wenn der Wassergehalt über 5% ansteigt, sich ins Gegenteil verkehren und die Malzqualität beeinträchtigen können. Nach Schjerning (128) werden teilweise unlösliche Eiweißkörper, welche Trübungen der Würze und des Bieres verursachen können, ganz unlöslich, oder solche, die durch das Darren suspensoid geworden sind, wieder in den emulsoiden Zustand übergeführt. Analog den beim Altbackenwerden des Brotes bekannten Verschiebungen der Hydratation von Kleber und Stärkekegel könnte man auch hier an solche Veränderungen der Quellfähigkeit von Kolloiden denken.

Schönfeld (129) wies nach, daß Malz, welches während 13 monatlicher Lagerung seinen Wassergehalt auf 11% erhöht hatte, eine Abnahme des koagulierbaren Stickstoffs um 6 bis 16% und eine Abnahme des

mit Zinksulfat fällbaren Albumosenstickstoffs um 5 bis 25% erfuhr. Auch Mertens (130) fand während der Lagerung des Malzes Abbauvorgänge vonstatten gehen, die sich in einer Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs kund geben. Erklärlich sind diese Veränderungen einerseits durch die zunehmende Quellung und damit Angreifbarkeit der Kornkolloide durch Enzyme und andererseits durch die im Laufe der Lagerung stattfindende Aktivitätssteigerung der Enzyme.

Geschrotetes Malz ist, wenn es einmal infolge besonderer betriebstechnischer Umstände im Schrotrumpf aufbewahrt werden muß, sehr rasch unerwünschten Veränderungen unterworfen, wofür die Zerstörung der Kornstruktur verantwortlich zu sein scheint.

C. Sudhaus

a) Maischprozeß.

1. Allgemeines über den Eiweißabbau.

Gegenüber dem Stärkeabbau tritt die Umwandlung der Eiweißkörper beim Maischprozeß quantitativ weit in den Hintergrund, denn die Proteine und ihre Abbauprodukte machen nur wenige Prozente der Gesamtextraktausbeute aus. Trotzdem aber spielen sie in qualitativer Beziehung eine wichtige Rolle, denn die niedermolekularen Stickstoffverbindungen sind für die Ernährung der Hefe bei der Gärung unerlässlich, die mittelmolekularen sind wesentliche Träger von Vollmundigkeit und Schaumhaltigkeit, während die höchstmolekularen, die eigentlichen Proteine oft für das Auftreten von Trübungen verantwortlich zu machen sind. Daraus ergibt sich, daß die Eiweißfrage in erster Linie eine Qualitätsfrage ist.

Der Stärkeabbau beim Maischen ist durch Extraktausbeute, Treberanalyse und Endvergärungsgrad einfach und zuverlässig zu überwachen. Beim Eiweißabbau liegen die Verhältnisse wesentlich komplizierter und ungünstiger, insofern als wir heute noch nicht mit der nötigen Sicherheit Menge und Qualität der in die Würze notwendigerweise überzuführenden Stickstoffverbindungen angeben können, ferner die Kontrollmethoden umständlicher und für die Beurteilung des Effektes weniger eindeutig sind und schließlich geltende Anschauungen über den Eiweißabbau beim Maischen sich als unzutreffend erwiesen haben.

Man neigte bis vor kurzem der Ansicht zu, daß der Stärkeabbau beim Maischen, der Eiweißabbau hingegen hauptsächlich beim Mälzen erfolge. Kolbach (131) konnte jedoch überzeugend nachweisen, daß diese Vorstellungen vor allem dadurch zustande kamen, daß man bei den analytischen Feststellungen den gesamten in Lösung gegangenen Stickstoff berücksichtigte anstelle des nur dauernd löslichen. Die Differenz der beiden ist der koagulierbare Stick-

stoff, dessen Menge abhängig von den verschiedensten Bedingungen außerordentlichen Schwankungen unterliegen kann.

Rechnet man den koagulierbaren Stickstoff mit zum löslichen Stickstoff hinzu, oder läßt ihn im andern Falle außer Berechnung, so ergeben sich nach Kolbach folgende Beziehungen:

	100 g Gerste	100 g Malz	Würze aus 100 g Malz	beim Mälzen	beim Maisch- gebildet
löslicher + koagul. N.	267 mg	552 mg	707 mg	285 mg	155 mg
dauernd lösl. N.	163 mg	381 mg	619 mg	218 mg	238 mg

Nach der ersten, früher allgemein üblichen Berechnungsweise müßte man schließen, daß der Eiweißabbau beim Mälzen (285 mg) ungleich stärker als der beim Maischen (155 mg) ist. Läßt man den koagulierbaren Stickstoff außer Betracht und berücksichtigt nur den allein maßgeblichen dauernd löslichen Stickstoff, so ergibt sich die überraschende und durch weitere Arbeiten bestätigte Tatsache, daß der Eiweißabbau beim Maischen nicht nur gleich stark, sondern oftmals sogar stärker als beim Mälzen ist. Damit aber hat der Maischprozeß hinsichtlich der Quantität des Eiweißabbaues an Bedeutung gewonnen. Das gleiche gilt auch, wenn wir seine qualitative Seite ins Auge fassen. Nach Kolbach besteht der beim Mälzen gebildete dauernd lösliche Stickstoff zu 56%, der beim Maischen gebildete zu 23% aus formoltitrierbarem Stickstoff. „In Bezug auf die Praxis der Bierbereitung ergibt sich daraus, daß beim Mälzen hauptsächlich diejenigen Stickstoffverbindungen gebildet werden, die zur Hefeernährung dienen, während beim Maischen mehr von den hochmolekularen, kolloiden Substanzen entstehen, denen eine große Bedeutung für den Schaum und die Vollmundigkeit des Bieres zukommt, die aber andererseits zu Trübungen Anlaß geben können“ (Kolbach).

Diese wichtigen Erkenntnisse neuerer Zeit regten dazu an, die in der Würze als Ergebnis des Maischprozesses vorliegenden Stickstoffverbindungen näher zu differenzieren, um aus Art und Menge der einzelnen Stickstofffraktionen eine Beurteilungsgrundlage zu gewinnen. Bereits bei der Gerste und beim Mälzungsprozeß hat man, wie dort bereits erwähnt wurde, Stickstoff-Differenzierungsmethoden angewandt, bei der Würze, wo aller Stickstoff in gelöster Form vorliegt, müssen diese Differenzierungsmethoden wesentlich subtiler sein, um Erfolg zu versprechen. Der Vollständigkeit halber sei im Folgenden auf die wichtigsten Methoden kurz eingegangen.

2. Stickstoff-Differenzierungsmethoden.

Bezüglich der mehrfach, insbesondere bei der Gerste erwähnten und kritisch gewürdigten Methode von Schjerning (15) erübrigt sich ein weiteres Eingehen.

Windisch, Kolbach und Hennecke (132) differenzieren den Würzestickstoff auf biologischen Wege in assimilierbaren und nicht assimilierbaren Stickstoff. Der Nachteil dieser an sich einfach auszuführenden Methode ist der, daß nur zwei große Fraktionen unterschieden werden und daß der assimilierbare Stickstoff normalerweise in nie mangelnder Weise in Wurzeln vorhanden ist und demgemäß kein besonderes Interesse beansprucht.

Viel wichtiger dagegen ist die Differenzierung des hochmolekularen Stickstoffes, zu welchen Zwecke man die seit langen bekannte Eigenschaft solcher N-Verbindungen mit Tannin Fällungen zu liefern, ausnützte. Lundin und Schröderheim (133) haben die Methode sorgfältig durchgearbeitet, die unter den von ihnen festgelegten Bedingungen etwa 25% des Würzestickstoffs als hochmolekulare Fraktion zu erfassen gestattet. Wie jedoch Fink und Wildner (134) zeigten, fällt das Tannin nicht selektiv nur hochmolekularen Stickstoff, sondern daneben auch Stickstoffverbindungen niederen Molekulargewichtes. Allerdings arbeiten die letztgenannten Autoren mit niedrigeren Tanninkonzentrationen als Lundin und Schröderheim.

Hochmolekulares Eiweiß wird sehr gut von Magnesiumsulfat gefällt, wovon bereits früher Schjerning und Myrbäck Gebrauch machten. Die Fällung ist vollständig und gut reproduzierbar, wenn das pH der Würze mit Schwefelsäure auf 1—2 gebracht wurde. Die $MgSO_4$ -Fällung erfaßt etwa 20—25% des Würzestickstoffs, also etwa ebensoviel als die Tanninfällung von Lundin und Schröderheim.

Uranylacetat fällt etwa 33% des Würzestickstoffs, nämlich Eiweißstoffe und einen beträchtlichen Anteil hoch- und mittelmolekularer Abbauprodukte. Die Analysenbedingungen sind von K. u. S. Myrbäck (135) festgelegt worden.

Nach Kolbach und Buse (136) lassen sich mit Hilfe von Aktivkohle etwa 55% des Würzestickstoffs unter festgelegten Bedingungen erfassen, wobei niedrigmolekularer Stickstoff praktisch nicht erfaßt wird.

Ähnliche Ergebnisse erzielte auch Stadnik (137), der außerdem (138) auch mit Hilfe von Jod und Tannin eine Fraktionierung versuchte.

Außer diesen bisher genannten, für wissenschaftliche Zwecke erfolgreich verwendeten Differenzierungsmethoden, benützt man im Betriebslaboratorium seit langem die Aufteilung des Würzestickstoffes in löslichen, koagulierbaren, dauernd löslichen und formoltitrierbaren Stickstoff als Hilfsmittel der Stickstofffraktionierung. Wegen der Einfachheit der Bestimmung hat sich die Methode in Betriebslaboratorien und Versuchsstationen mehr und mehr eingeführt. Durch die Formoltitration werden die freien Aminogruppen bzw. die ihnen entsprechenden Carboxylgruppen erfaßt, welche in erster Linie den Aminosäuren und den Peptiden entstammen, während die hochmolekularen Eiweißabbauprodukte und die echten Proteine nur einen verschwindend kleinen Anteil ihres Gesamt-Stickstoffs in formoltitrierbarer Form enthalten. Man ist also durchaus berechtigt den formoltitrierbaren Stickstoff als ein Maß des niedermolekularen Stickstoffs anzusehen, der gleichzeitig der Hefe vorzüglich als Stickstoffnahrung dient. Die Eiweißlösung in ihrer Gesamtheit, die in erster Linie auf die Wirkung der Proteinase zurückzuführen ist, wird zweckmäßig durch den prozentualen Anteil des löslichen Würzestickstoffs am Gesamt-Malzstickstoff ausgedrückt.

3. Der Proteinabbau beim Maischen.

Wie bereits einleitend anlässlich der allgemeinen Bemerkungen zu diesem Kapitel erwähnt wurde, erfolgte zunächst eine wichtige Richtigstellung bisheriger Ansichten dahingehend, daß die Intensität des Eiweißabbaues beim Maischen hinter jener beim Mälzen keineswegs zurückstehe, sondern ihr mindestens gleichkomme, sie manchmal sogar übertreffe.

Eine andere Vorstellung hatte sich über die Bedeutung der Eiweißrast herausgebildet. Allgemein wurde der Standpunkt vertreten, daß durch eine etwa halbstündige Rast bei Temperaturen von 45—55° Malze von ungenügender oder mangelhafter Lösung ohne Schwierigkeiten technologischer Art, wie schlechte Filtration, mangelhafte Klärung und Vergärung, Auftreten von Trübungen sich anstandslos verarbeiten lassen, was man auf eine Wirkung proteolytischer Enzyme auf das Eiweiß etwa im Sinne einer Nachholung und Verbesserung dessen, was in den Mälzereien versäumt wurde, zurückzuführen pflegte. Bei überlöstem Malzen soll die Übergehung der Eiweißrasttemperaturen zur Erhaltung hochmolekularer, für Vollmundigkeit und Schaumhaltigkeit förderlicher Stickstoffverbindungen beitragen.

Kolbach und Buse (139) untersuchten nun mit Hilfe einer Reihe der oben erwähnten Differenzierungsmethoden in neuerer Zeit nochmals eingehend den Eiweißabbau beim Maischen, indem sie Malz bei 40, 50, 60 und 70° jeweils $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 4 Stunden maischten und in den Würzen den Gesamtstickstoff, den dauernd löslichen, den formoltitrierbaren sowie den mit Kohle, Tannin und Magnesiumsulfat fällbaren Stickstoff ermittelten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich folgendes: Hält man die Maischtemperatur konstant, so nehmen mit zunehmender Maischdauer alle mit den verschiedenen Methoden bestimmbaren Stickstofffraktionen dauernd zu. Nachdem aber Magnesiumsulfat, Kohle und Tannin vorzugsweise hochmolekulare Stickstoffverbindungen selektiv fällen, nimmt also bei zunehmender zeitlicher Eiweißrast der hochmolekulare, kolloide Stickstoff zu. Dies steht im Gegensatz zu der oben erwähnten bisherigen Auffassung, daß im Laufe einer längeren Eiweißrast eine Verarmung an hochmolekularem Stickstoff eintreten müsse. Besonders stark ist die Zunahme an kolloidem Stickstoff bei höheren Temperaturen, so findet man z. B. daß die Kohlefraktion bei gleicher Maischdauer am größten bei 60—65°, die Magnesiumsulfatfraktion am größten bei 70° und die Tanninfraktion am größten bei 60—70° ist. Bei niedrigeren Temperaturen z. B. bei 45 und 50° nehmen die niedermolekularen, formoltitrierbaren Stickstoffverbindungen stärker als die hochmolekularen zu, sodaß der hochmolekulare N, obwohl er absolut auch zunimmt, in Prozenten des dauernd löslichen N abnimmt. Die Zunahme des hochmolekularen Stickstoffs bei höheren Temperaturen kann aus den Eigenschaften der beiden proteolytischen Enzyme erklärt werden, auf welche bei der Keimung bereits hingewiesen wurde. Die Peptidasen, welche für die Bildung des niedrigmolekularen Stickstoffs vorwiegend verantwortlich zu machen sind, besitzen eine größere Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen als die Proteinase, dazu kommt noch, daß sie sich beim pH der Würze, besonders dann, wenn weiches Wasser zum Einmaischen verwendet oder die Maische gesäuert wurde, in einem ungünstigen Milieu befinden. Mit steigender Maischtemperatur werden sie zunehmend geschädigt und stellen ihre Tätigkeit mehr und mehr ein. Die Proteinase ist gegen höhere Temperaturen widerstandsfähiger, das pH der Maische liegt ihrem optimalen pH ziemlich nahe. Die Proteinase spaltet das unlösliche Eiweiß in lösliche, größere Bruchstücke, von welchen die anfangs entstehenden den Charakter hochmolekularer, kolloider Eiweißabbauprodukte besitzen, manchmal sogar den Proteinen noch nahestehen. Diese

hochmolekularen Bruchstücke können, sofern die Proteinase noch genügend wirksam ist und wenn sie günstige Temperatur- und pH-Bedingungen vorfindet, noch weiter zu mittelmolekularen Abbauprodukten aufgespalten werden. Unter solchen besonders günstigen Umständen können diese mittleren Abbaustufen dann eine relative Zunahme aufweisen.

Aus einer Arbeit von Windisch, Kolbach und Schild (140) geht hervor, daß die optimale Temperatur der beiden Proteasen des Malzes abhängig ist von der Maischdauer. Die Bildung des dauernd löslichen Stickstoffs als Maß der Proteinasewirkung und die des formtitrierbaren N als Maß der Polypeptidspaltung liegt abhängig von der Maischdauer bei folgenden optimalen Temperaturen:

Maischdauer	dauernd lösl. N.	formtitrierbarer N.
$\frac{1}{4}$ Std.	61—63°	56—60°
$\frac{1}{2}$ „	60—61°	54—58°
1 „	57—59°	52—56°
2 „	56—58°	48—52°
3 „	55—57°	47—51°

Diese Erscheinung, die man auch bei anderen Enzymen, wie der Amylase findet, ist darauf zurückzuführen, daß bei längerer Maischdauer bereits eine Inaktivierung der Enzyme einzutreten beginnt, die größer ist, als die aktivierende Wirkung der Temperatur auf die enzymatische Reaktion selbst.

Das optimale pH für beide Enzyme erweist sich ebenfalls abhängig von der Temperatur, wie folgende Feststellungen von Windisch, Kolbach und Schild beweisen.

Temperatur	dauernd lösl. N.	formtitrierbarer N.
30°	pH 4,3—4,7	4,3—4,7
40°	4,3—4,7	4,4—4,8
50°	4,3—4,7	4,4—4,8
60°	4,5—4,9	4,5—4,9
65°	4,6—5,0	4,5—4,9
70°	4,9—5,3	4,6—5,0

Da die Peptidasen bei einem pH in der Nähe des Neutralpunktes ihre beste Wirkung entfalten, zwischen pH 4 und 5 aber praktisch keine Wirkung mehr ausüben, handelt es sich bei obigen optimalen pH-Bereichen für die Bildung des formtitrierbaren Stickstoffs um die Tätigkeit der Proteinase.

Nur bei Einmaischen bei niedrigeren Temperaturen (unter 45—50°) und wenn das pH der Maische in der Nähe von 6 liegt, kann mit

einer stärkeren Wirkung der Peptidasen gerechnet werden. Mit Zunehmen der Maischekonzentration steigt die Eiweißlösung an, im Gegensatz zur Amylase, wo das Gegenteil der Fall ist. Bei einem Verhältnis von Schüttung zu Guß von 1 : 2 ist die Zunahme des dauernd löslichen Stickstoffs um 12% größer als bei einem Verhältnis von 1 : 5,3 (60°, 1 Stunde Maischdauer). Der formoltitrierbare N nimmt in der Dickmaische relativ stärker zu als in der Dünnmaische, sodaß der Formol-N in Prozenten des dauernd löslichen N mit der Maischekonzentration ansteigt. Durch Wahl der Maischekonzentration läßt sich also in gewissen Grenzen das Verhältnis von höher zu niedriger molekularem Stickstoff regeln.

Die bisher referierten neueren Erkenntnisse über den Eiweißabbau beim Maischen sind gewissermaßen an Modellversuchen gewonnen, bei welchen die Eiweißrasttemperatur vom Einmaischen bis zum Abmaischen eingehalten wurde. In der Praxis muß die Eiweißrast mit Rücksicht auf den Stärkeabbau mit dem jeweiligen Maischverfahren kombiniert werden. Es folgen demgemäß auf die Eiweißrasttemperaturen stets höhere Temperaturen, wodurch das Bild des Eiweißabbaues wesentlich kompliziert wird. Bei einer Kombination von Eiweißrast mit Weitermaischen bis 70° und Halten einer Rast bei 70° tritt nach Kolbach und Buse ein weitgehender Ausgleich der Stickstoffverhältnisse ein. Es zeigt sich, daß ein Einhalten einer Eiweißrast bzw. die Rasttemperaturen nur von untergeordneter Bedeutung für den absoluten und relativen Gehalt der Würze an kolloidem Stickstoff ist. Es scheinen die proteolytischen Enzyme beim Einhalten einer Eiweißrast von 40—50° noch so geschont zu sein, daß sie beim Erhitzen der Maische auf höhere Temperaturen z. B. 70° noch sehr kräftig zu wirken vermögen. Nach neueren von Kolbach und Simon (141) vermittelten Erkenntnissen, kommen die Proteasen im Malz zum Teil in löslicher, zum Teil in unlöslicher Form vor. Während die löslichen Proteasen bei 70° rasch ihre Aktivität verlieren, bewahren sie die unlöslichen Proteasen infolge des Schutzes, den sie durch ihre Bindung an die Plasmakolloide erfahren, auch bei 70° noch längere Zeit. Die bei 70° entstehenden, immerhin noch beachtlichen Mengen dauernd löslichen Stickstoffs sind so gut wie ausschließlich auf die Tätigkeit der unlöslichen Proteasen zurückzuführen.

Wie außerordentlich die Wirkung der unlöslichen Proteasen ist, geht aus folgender Tabelle hervor. Durch reichliches Auswaschen mit Wasser wurden die löslichen Proteasen praktisch vollkommen aus dem Malz entfernt. Die „Trebermaische“ wurde 2 Stunden bei

40, 50, 60 und 70° gehalten und in der Würze die verschiedenen Stickstofffraktionen ermittelt. (Kolbach und Simon).

Stickstoffzunahme beim Maischen in mg je 100 g Malztrockensubst.

Temperatur	40°	50°	60°	70°
löslicher N	99	215	211	155
dauernd lösl. N.	93	210	204	147
Formol-N.	34	71	59	33
Formol-N. in % des dauernd lösl. N.	37	34	29	22

Bemerkenswert an diesen Versuchen ist die Tatsache, daß selbst bei 70° in den Trebermaisichen noch sehr viel dauernd löslicher und formoltitrierbarer Stickstoff gebildet wird, d. h., daß die unlöslichen Enzyme bei dieser hohen Temperatur eine sehr erhebliche Wirkung aufweisen. Gemessen an den in Malzmaisichen gegebenen Verhältnissen beträgt die Menge des in den Trebermaisichen in Lösung gegangenen dauernd lösl. Stickstoffs $\frac{4}{5}$ bis $\frac{3}{4}$ der ersteren. Daraus muß man mit Recht schließen, daß den unlöslichen Proteasen eine sehr erhebliche Bedeutung beim Eiweißabbau zukommt. Der Eiweißabbau in den Malzauszügen tritt demgegenüber sehr in den Hintergrund, auch sind die löslichen Enzyme bedeutend empfindlicher gegen höhere Temperaturen, bei 70° ist ihre Wirkung bereits völlig erloschen.

Auf Grund der Versuche von Kolbach und Simon müssen wir fernerhin annehmen, daß das unlösliche Eiweiß des Malzes, also Reste des Edestins, ferner Hordein und Glutelin die Quellen für den in Lösung gehenden Stickstoff darstellt. An diesen unlöslichen Proteinen greifen die unlöslichen Proteasen an und führen sie in lösliche Stickstoffverbindungen über, wobei das Stadium der löslichen koagulierbaren Eiweißstoffe entweder nicht durchlaufen wird, oder etwa zunächst gebildetes koagulierbares Eiweiß, sehr schnell in einfachere nicht koagulierbare Bruchstücke zerfällt.

An obiger Tabelle ist weiterhin bemerkenswert, daß bei 70° die Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs in der Trebermaisiche den gleichen Zahlenwert wie bei 40° erreicht (33 und 34 mg). Da bei 70° die Peptidasen nach den Erfahrungen an Malzauszügen unwirksam geworden sind, muß der hohe formoltitrierbare Stickstoff auf die Tätigkeit der Proteinase zurückgeführt werden, welche die in Lösung gebrachten Eiweißabbauprodukte anscheinend noch sehr kräftig zu Polypeptiden mittlerer Molekulargröße abbaut, wodurch sich die erheblichen Werte des Formol-N erklären ließen, es sei denn man müßte den unlöslichen Peptidasen eine ganz besonders

hohe Hitzestabilität zuerkennen. Hier ergaben sich noch einige Lücken unserer Erkenntnis, die durch weitere Forschungen erst geschlossen werden müssen.

Die große Empfindlichkeit der in der Maische in Lösung befindlichen proteolytischen Enzyme hat bereits Kolbach (loc. cit. 58) beobachtet, als er die Filtrate von Malzmaischen, die bei verschiedenen Temperaturen gemischt waren, auf ihre eiweißabbauende Wirkung gegenüber Edestin untersuchte. Bei 65° war die Vernichtung der Proteasen zu 97%, bei 70° vollständig erfolgt. Lüers, Krauß, Hartmann und Vogt (loc. cit. 142 und Dissert. Vogt, T. H. München 1934) verfolgten die Veränderungen der proteolytischen Aktivität im Verlauf von Praxissuden, indem sie die Maischefiltrate auf Gelatine zur Einwirkung brachten und durch die Formoltitration den erfolgten Abbau bestimmten. Bei den Hochkurzmaischsuden mit Einmaischtemperaturen von 63° war bereits kurz nach dem Einmaischen keinerlei proteolytische Aktivität mehr nachweisbar. Für Zweimaischsude gestaltete sich die Veränderung der proteolytischen Aktivität während des Sudverlaufs, um ein ausgewähltes Beispiel zu bringen, folgendermaßen:

	Proteaseeinheiten 10 ⁵ in 100 kg Schüttung.
Gesamtmaische vor Ziehen der 1. Maische (52°)	18,14
a) 1. Maische vor dem Kochen (70°)	24,13
b) 1. Maische nach dem Kochen	0
c) Restmaische vor Zubrühen der 1. Maische (52°)	9,07
d) Gesamtmaische n. Zubrühen der 1. Maische (68°)	3,31
e) 2. Maische vor dem Kochen	1,56
f) 2. Maische nach dem Kochen	0
g) Restmaische vor d. Zubrühen der 2. Maische (68°)	6,45
h) Ges.-Maische nach Zubrühen der 2. Maische (78°)	6,55
i) Vorderwürze	3,48
k) Pfannevollwürze	0

Vom Einmaischen bis zur Vorderwürze ist demnach proteolytische Aktivität nachweisbar. Vom Einmaischen bis zur Temperatur von 70° in der 1. Kochmaische nimmt die Aktivität der Proteasen noch zu, was auf ein allmähliches Inlösengehen der Enzyme zurückgeführt werden dürfte. Die Restmaische hat beim Stehen bei 52° die Hälfte ihrer Proteasenaktivität verloren, ein Beweis dafür, daß bereits bei diesen an sich noch günstigen Temperaturen die Inaktivierung schon stark einsetzt. Auffallend ist, daß die Gesamtmaische beim Stehen bei 68° (Probe d und g) wieder eine Zunahme

der Enzymkonzentration erfuhr, die auch durch das Zubrühen der enzymatisch inaktiven 2. Maische nicht herabgesetzt wurde. Es wäre allein durch die Verdünnung zu erwarten gewesen. Es wäre daran zu denken, daß das Milieu lösend auf unlösliche Proteasen wirkt und der Lösungsvorgang wenigstens für eine kurze Zeit die Inaktivierung überkompensiert.

Bei den Hochkurzmaischsuden konnte, wie gesagt, keinerlei proteolytische Aktivität schon bald nach dem Einmaischen festgestellt werden; die Milieubedingungen scheinen hier grundlegend anders zu sein als bei den Zweimaischesuden. Wenn aber trotzdem sich die Stickstoffverhältnisse der Ausschlagwürzen beider Maischverfahren nicht absonderlich unterscheiden, so ist das ein erneuter Beweis dafür, daß für den Eiweißabbau in erster Linie die unlöslichen, zellgebundenen Proteasen verantwortlich sind, während die löslichen Proteasen nur eine untergeordnete Bedeutung besitzen.

Aus den obigen Ausführungen wurde der Schluß gezogen, daß die im Malz vorhandenen unlöslichen Proteasen unlösliche Proteine des Kornes in lösliche Proteine oder Abbauprodukte beim Maischen überführen. Als solche unlösliche Proteine kommen Glutelin, Hordein und Edestin, soweit sie beim Mälzen nicht abgebaut wurden, in Betracht.

Hinsichtlich der Edestine oder besser gesagt der die Globulinfraktion aufbauenden Komponenten liegen aus neuester Zeit Befunde des schwedischen Forscherkreises vor, über welche Sandegren (4) berichtet. Die Versuche wurden in der gleichen Weise wie an Gersten- und Malzauszügen auch an Kongreßlaboratoriumswürzen durch Fällung mit Ammonsulfat durchgeführt. Nur die β -Globulin-komponente wurde ebenso wie im Malz auch in der Würze gefunden, sodaß die proteolytischen Enzyme des Malzes nicht fähig waren, die β -Komponente beim Maischen abzubauen. Nachdem die beim Maischen wirkende Protease dem Papaintyp angehört und durch Blausäure um 50% in ihrer Aktivität gesteigert werden kann, wurde auch ein Maischversuch unter Aktivierung mit Blausäure durchgeführt, trotzdem aber fand sich wiederum die β -Fraktion in der Würze.

Um festzustellen, wie sich die Globuline gegenüber den Maischtemperaturen unter Ausschluß der Enzyme des Malzes verhalten, wurden reine aus Gerste dargestellte Präparate von β und $\alpha + \gamma$ -Fraktion dem Gang des Kongreßmaischverfahrens unterworfen. Die Lösung der β -Fraktion blieb während des ganzen Maischprozesses völlig klar und die Sedimentationsdiagramme in der Ultrazentri-

fuge waren vor und nach dem Maischprozeß identisch. Lösungen der $\alpha + \gamma$ -Fraktion dagegen zeigten nach dem Maischen beträchtliche Niederschläge, die sich nur sehr schwer und in geringem Betrag in Pufferlösungen lösten, doch enthielten die Lösungen keine der genannten Fraktionen mehr. Die gemaischte Originallösung der $\alpha + \gamma$ -Fraktion enthielt jedoch noch geringe Mengen sowohl α - wie auch γ -Globulin. Die α -Komponente hatte viel stärker abgenommen als die γ -Komponente, sodaß die letztere hitzestabiler ist als die erstere.

Schließlich wurde noch Malz als auch Lösungen der einzelnen Komponenten des Globulins unter Zusatz von mit HCN aktiviertem Papayotin gemaischt und dabei gefunden, daß die β -Komponente in beiden Fällen vom Papayotin abgebaut wurde, wobei unter den Abbauprodukten ziemlich hochmolekulare Verbindungen gefunden wurden. α - und γ -Komponente dagegen schienen gegenüber dem Papayotin widerstandsfähiger zu sein.

Lüers, Stricker und Schild (112) verfolgten unter verschiedenen Maischbedingungen ebenfalls den Eiweißabbau, indem sie, ähnlich wie beim Mälzen neben den bekannten Stickstoffverbindungen auch einzelne Aminosäuren auf kolorimetrischem Wege quantitativ bestimmten. Die Ergebnisse allgemeiner Art bestätigten die Befunde von Kolbach und Buse. Eine Eiweißrast vermehrt unter günstigen Bedingungen zwar den Aminostickstoff, aber gleichzeitig nimmt immer auch der hochmolekulare Stickstoff zu, besonders dann, wenn höhere Eiweißrasttemperaturen eingehalten werden. Aus dem unterschiedlichen Verhalten der einzelnen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Arginin muß man schließen, daß die im Malz vorhandenen Peptidasen verschiedene, das Polypeptidmolekül strukturell spezifisch angreifende Enzymtypen enthalten, was sich mit den heutigen Vorstellungen über Polypeptidasen (Amino- und Carboxypolypeptidasen) deckt. Die Empfindlichkeit der einzelnen Peptidasentypen gegen höhere Temperaturen ist eine verschiedene, was sich bereits beim Darren und in Fortsetzung dann beim Maischprozeß äußert.

Der niederst molekulare Stickstoff, nämlich der Ammoniakstickstoff vermehrt sich nach Windisch und Kolbach (143) beim Maischen in gleicher Weise, wie der Gesamt- und formoltitierbare Stickstoff, sodaß er in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausgedrückt sich nicht verändert. Eine Eiweißrast bei 45° brachte eine Vermehrung des Ammoniakstickstoffs von 1,32 mg bei $\frac{1}{2}$ Std. auf 1,92 mg bei 3 Std. Rast.

Wenn wir nun aus den neueren Arbeiten über das Wesen des Eiweißabbaues beim Maischen die praktischen Schlußfolgerungen zu ziehen versuchen, so kommen wir zu der Feststellung, daß keines der praktisch geübten Maischverfahren im Stande ist, den Gehalt der Würze an kolloiden Eiweißkörpern unter den Wert zu bringen, der durch den Gehalt des Malzes an bereits vorgebildeten, löslichen Eiweißstoffen gegeben ist. Ein zuweitgehender Eiweißabbau beim Maischen und damit eine Veränderung an kolloiden Stickstoffverbindungen kann gar nicht eintreten, da, wie wir gesehen haben, jede Eiweißrast den absoluten Gehalt der Würze an kolloidem Stickstoff erhöht. Wie bereits weiter oben angedeutet wurde, besteht an sich kein Zweifel darüber, daß beim Maischen mangelhaft gelöster Malze das Einhalten einer Rast bei 45—55° einwandfrei feststellbare, technische Erfolge bringt, nur sind diese nach den neueren Erkenntnissen nicht mit einem höheren Gehalt an hochmolekularen Stickstoffverbindungen zu erklären, denn beim Maischen eines schlecht gelösten Malzes nehmen diese bei Intensivierung des Maischverfahrens z. B. durch eine Eiweißrast ebenso zu wie bei einem gut gelösten Malz. Wenn man beim Verbrauen von schlecht gelösten Malzen ohne die Einhaltung der genannten Rasten Filtrations- und Klärungsschwierigkeiten beobachtet, welche bei Einschaltung einer „Eiweißrast“ verschwinden, so müssen nach Ansicht Kolbachs und auch des Verfassers die nachweisbaren Erfolge entweder mit dem Eiweißabbau überhaupt nichts zu tun haben, oder aber in einem anderen Sinne als dem bisherigen mit dem Eiweißabbau zusammenhängen. Auf experimenteller Basis ist eine Erklärung der Sachlage noch nicht möglich, dagegen vermögen theoretische Überlegungen zumindestens erhellend zu wirken und den Weg für weitere Forschungen zu weisen. Bleibt man zunächst bei den Eiweißkörpern als den eventuellen Störenfrieden, so läßt sich nach den Untersuchungen Schjernings (loc. cit. 15) die Möglichkeit erwägen, daß ein Malz mit guter Lösung Eiweißstoffe von ganz bestimmten Abbaugrad enthalten muß. Ist ein Eiweißstoff, wie das Schjerningsche Albumin II noch im Malze vorhanden und wird es beim Maischen nicht weiter abgebaut, dann kann es zu den in der Praxis beobachteten störenden Auswirkungen kommen. Der allgemeine Begriff „kolloider hochmolekularer Stickstoff“ ist hier also auf ein spezifisches Eiweißindividuum zurückgeführt und eingeschränkt. Nach der mehrfach erwähnten Kritik an den Schjerningschen Stickstoffdifferenzierungsmethoden ist es nicht möglich über die hier angedeutete Vorstellung zu entscheiden, wenngleich

ihr Zutreffen durchaus im Bereich der Möglichkeit liegt. Es ergeben sich nämlich noch weitere Gesichtspunkte, die als eine Stütze für die Beteiligung eines Proteinindividuums an den genannten Erscheinungen betrachtet werden könnten. Wie bereits bei der Besprechung der proteolytischen Enzyme während der Keimung auseinandergesetzt wurde, haben Blagoveschensky und Sossiedow, Northrop und Kosmin beobachtet, daß in Getreidesamen eine Proteinasekomponente vorkommt, welche sich durch eine starke desaggregierende Wirkung auf hochmolekulare Eiweißkörper, wie Gliadin, Glutenin und Gelatine auszeichnet. Lüers, Hüttinger und Löther (loc. cit. 67—72) konnten diese Befunde auch an Malzauszügen bestätigen. Es erscheint möglich und wahrscheinlich, daß diese Proteinasekomponente „Gelatinase“ genannt, spezifisch auf einige Bindungen eingestellt ist, welche mehrere Grundkörper zum hochmolekularen Eiweiß zusammenfügen. Werden diese Peptid- oder vielleicht auch Sulfhydryl-Bindungen gelöst, so zerfällt der hochmolekulare Eiweißkörper in die Grundkörper, wobei z. B. die Lösung von 5 Bindungen das Molekulargewicht angenommen 85 000 bereits auf 17 000 herabgesetzt, was genügen würde, um die physikalisch-chemischen Eigenschaften z. B. Neigung zu Trübungen, Instabilität, Neigung zur Symplexbildung mit anderen Kolloiden von Grund auf in günstigem Sinne zu verändern. Eine Nachprüfung dieser theoretischen Möglichkeit scheitert vorerst an dem Fehlen analytischer Methoden.

Eine weitere, von der vorigen gänzlich unabhängigen Vorstellung ist die folgende: Die „Eiweißrasttemperaturen“ von 45—55°, welche wir aus den praktischen Erfahrungen heraus als besonders erfolgreich bezeichnen müssen, sind nun nicht nur für die proteolytischen Enzyme, sondern auch für manche andere besonders günstig. Das gilt z. B. für den Abbau der Pentosane, die Hydrolyse des Xylans zu Xylose, ferner für den enzymatischen Abbau des von Piratzky beschriebenen Amylans, das infolge seiner hochkolloiden, schleimigen Beschaffenheit die Filtration der Würze erschwert, für den Abbau der Gummistoffe und schließlich auch für die Aufspaltung organischer Phosphorsäureverbindungen durch die Phosphatasen. Eine Rast bei 45—55° ist also auch in der Lage eine Reihe hochkolloider Stoffe von Nichteiweißnatur enzymatisch in einfachere, weniger kolloide Stoffe überzuführen. Es liegt nahe — für das Amylan wurde es von Piratzky nachgewiesen — anzunehmen, daß in mangelhaft gelösten Malzen der Abbau derartiger Stoffe während der Keimung nicht weit genug fortgeschritten ist und daß die gün-

stigen Auswirkungen einer „Eiweißrast“ während des Maischprozesses auf einen enzymatischen Abbau gerade solcher Stoffe zurückzuführen sind.

Welche der beiden Vorstellungen die zutreffende ist, können erst weitere experimentelle Arbeiten entscheiden. Die Möglichkeit besteht, daß beide zu Recht bestehen. Da nach bisherigen Erfahrungen die im Werdegang des Bieres auftretenden Trübungen niemals chemisch einheitlich sind, sondern aus Symplexen oder Koazervaten verschiedener organischer und auch anorganischer (SiO_2) Komponenten sich zusammensetzen, ist die Vorstellung nicht unbegründet, daß durch einen enzymatischen Abbau aus einer Reihe solcher Kolloide Bruchstücke entstehen, deren Molekulargröße und damit ihre kolloiden Eigenschaften es ihnen nicht mehr erlauben, zu störenden Symplexen miteinander in Verbindung zu treten. Es ist zu hoffen, daß eine feinere kolloidchemische Analyse der Würzebestandteile unsere Kenntnisse auf diesem schwierigen Gebiet erweitern wird.

Wenn wir also den in der Praxis des Braugewerbes eingebürgerten Begriff der Eiweißrast weiter verwenden, so müssen wir uns jedenfalls darüber im Klaren sein, daß wir damit nur einen Begriff aus der Fülle unbekannter Reaktionsabläufe umschreiben. Wie mehrfach erwähnt kann der Stärkeabbau hinsichtlich der Intensität seines Ablaufes beim Maischen mit genügender Zuverlässigkeit festgestellt werden. Doch spielt für die Güte des Würzeextraktes auch die Intensität des Ablaufes anderer enzymatischer Reaktionen ebenfalls eine wichtige Rolle. Da es nun sehr schwer oder praktisch unmöglich ist, verschiedene enzymatische Reaktionen quantitativ zu verfolgen, schlug Kolbach (144) vor, zur Beurteilung der Intensität eines Maischverfahrens den Eiweißabbau als Repräsentanten der übrigen enzymatischen Reaktionsabläufe zu wählen, womit man einerseits seiner allgemeinen Bedeutung Rechnung trägt und andererseits berücksichtigt, daß die übrigen enzymatischen Reaktionen hinsichtlich ihrer Milieubedingungen (Temperatur, pH, Zeit) dem Eiweißabbau ähneln.

Der Umfang des Eiweißabbaues kann auf einfache analytische Weise durch die Bestimmung des dauernd löslichen Stickstoffs der Würze in Prozenten des Malzstickstoffs ermittelt werden. Da die Menge des dauernd löslichen Würzestickstoffs aber nicht nur von den Maischbedingungen sondern von dem jeweils im Malz vorgelassenen abhängig ist, muß der letztere ebenfalls bestimmt

werden, was am zweckmäßigsten durch die Ermittlung der Eiweißausbeute beim Kongreßverfahren erfolgt. Setzt man die Eiweißausbeute beim Kongreßverfahren gleich 100, so hat man eine brauchbare Vergleichsbasis gefunden, die Intensität des Betriebsverfahrens mit der Intensität des Kongreßverfahrens in Beziehung zu setzen. Durch dieses methodische Vorgehen fällt auch der Einfluß des Malzes, wenn ein Wechsel desselben in der Praxis vorgenommen wird, hinweg. An analytischen Operationen sind folgende erforderlich: 1. Bestimmung des Malzstickstoffs. 2. Bestimmung des Stickstoffs in der filtrierten Ausschlagwürze und 3. Bestimmung des Stickstoffs in der Kongreßwürze, nachdem diese 2 Stunden mit der der Praxis entsprechenden Menge gemahlenen Hopfens gekocht wurde.

Ergibt die Eiweißausbeute (Würze-N in % des Malz-N) beim Betriebsverfahren z. B. 38,2%, beim Kongreßverfahren 36,0, so berechnet sich die Intensität des Eiweißabbaues beim Betriebsverfahren zu

$$\frac{38,2 \times 100}{36,0} = 106\%.$$

Diese Vergleichszahl schlägt Kolbach

als Maßstab für die Intensität des Maischverfahrens vor. Nach den bisherigen Untersuchungen schwankt die Intensitätszahl zwischen 38 und 117 und liegt im Mittel bei 105. Es ergibt sich folgendes Beurteilungsschema:

Intensitätszahl	Intensität des Maischverfahrens
über 110	hoch
von 100 bis 110	normal
unter 100	niedrig.

Ein Dreimaichsud hatte z. B. die Intensitätszahl 109, ein Zweimaichsud aus dem gleichen Malz eine solche von 95. Verlängerung der Eiweißrast beim 2. Maichsud von 15 auf 60 Minuten (bei 52°) steigerte die Intensitätszahl auf 105. In ähnlichem Sinne wirkte auch eine Säuerung (J. Z. = 103.)

Durch eine *Säuerung* der Maische wird gewöhnlich der lösliche Stickstoff in der Würze erhöht. Gleichzeitig gehen auch mehr Phosphate in Lösung. Beide Faktoren wirken sich in einer Erhöhung der Pufferung aus, sodaß oft der angestrebte Effekt, nämlich eine pH-Verschiebung nach der sauren Seite illusorisch wird. Aus diesem Grunde ist man zur Säuerung der abläuternden Würze übergegangen, die wesentlich effektvoller verläuft und den Charakter des eingeschlagenen Maischverfahrens nicht verändert. Neuere Literatur zur Säuerung von Maische und Würze: Kolbach, Haußmann und Wilharm (145), Schütza (146) Lüers und Schrempp (147).

Während des Maischprozesses nimmt die Menge des koagulierbaren Stickstoffs ab, auch wenn keine Maischen gekocht werden, denn die Hitzedenaturierung der Proteine beginnt bereits bei Temperaturen über 50° merklich in Erscheinung zu treten. Kolbach und Wilharm (148) geben dafür folgendes Zahlenbeispiel:

	koag. N in 100 ccm Würze
Malzauszug	28,0 mg
Kongreßwürze	12,0 mg
Betriebsvorderwürze	6,0 mg
Ausschlagwürze	2,1 mg

Mehr als die Hälfte des koagulierbaren Stickstoffs werden also bereits beim Laboratoriumsinfusionsverfahren ausgeschieden. Der Gehalt der Dekoktionswürzen der Praxis an koagulierbaren N beträgt für 100 ccm 12%ige Würze zwischen 8 und 4, im Mittel 6 mg. Der Unterschied gegenüber dem Kongreßverfahren (ca. 12 mg) ist auf die eiweißfallende Wirkung des Maischekochens zurückzuführen.

Nachdem aber von den 6 mg koagulierbaren Stickstoffs der Betriebsvorderwürze beim späteren 2 stündigem Würzekochen nur noch 4 mg ausgeschieden werden, muß man annehmen, daß der koagulierbare Stickstoff des Malzes in einen leicht und einen schwer koagulierbaren Anteil zerfällt. Vom letzteren wird ein Teil beim Maischekochen ausgeschieden. Da der noch koagulierbare, in der Würze verbleibende Reststickstoff hochmolekularen echten Proteinstickstoff darstellt, der in erster Linie für Trübungen des Bieres verantwortlich ist, gewinnt seine möglichst weitgehende Abscheidung praktisches Interesse. Inwieweit dazu die Bedingungen des Maischekochens beitragen zeigen die Ergebnisse der Arbeiten von Kolbach und Wilharm.

Der Einfluß der Kochdauer ergab sich aus Versuchen, bei welchen Kongreßmaischen nach Abschluß des Maischverfahrens zum Kochen gebracht und dann verschieden lange im Kochsalzbad gekocht wurden. Auf 12%ige Würze berechnet ergaben sich folgende Werte:

Kochdauer Minuten	pH nach dem Kochen	koagulier- barer N	koagu- lierter N
0	5,70	9,60	0
15	5,67	7,60	2,00
30	5,65	6,51	3,09
60	5,61	4,71	4,89

Mit zunehmender Kochdauer nimmt also die Menge des koagulierten Stickstoffs zu, jedoch führt die mit dem Fortschreiten des Ko-

chens einhergehende Verarmung der Würze zu einer zunehmenden Verlangsamung der Ausscheidung. In diesem Zusammenhang ergibt sich die den Praktiker interessierende Frage, ob es für das spätere Würzekochen von Vorteil ist, beim Maischekochen möglichst viel koagulierbaren Stickstoff auszuschcheiden. Kolbach und Wilharm kommen auf Grund ihrer Experimente zu einer Bejahung der Fragestellung und führen an, daß eine intensive Ausscheidung des koagulierbaren Stickstoffs beim Maischekochen eine Verkürzung des Würzekochens erlaubt, die für 0,5 mg koagulierbaren N in 100 ccm (Herabsetzung von 2,70 auf 2,20 mg) bei Hochleistungspfannen mit 10%iger Verdampfung immerhin 25—30 Minuten ausmacht.

Der Einfluß des pH auf die Eiweißkoagulation beim Maischekochen geht aus folgender Tabelle von Kolbach und Wilharm hervor:

pH vor Kochen	in 12%iger Würze	
	koagulierbarer N	koagulierter N
6,78	3,31	6,09
6,33	5,34	4,26
5,77	5,72	3,88
5,19	6,61	2,99

Es ist bemerkenswert, daß in dem untersuchten pH-Bereich, kein pH-Optimum für die Koagulation des Stickstoffs gefunden wurde, sondern dieses scheint vielmehr noch jenseits von pH 6,78 zu liegen. Beim Hopfenkochen dagegen ergibt sich ein pH Optimum bei etwa 5,2, die Unterschiede im Verhalten von Maische und auch Würze einerseits, und gehopfter Würze andererseits dürften wohl auf die Mitwirkung des Hopfengerbstoffs zurückzuführen sein.

Zwischen Maischekonzentration und Eiweißkoagulation bestehen keine eindeutigen Beziehungen.

Der Einfluß der Kochintensität wurde dadurch ermittelt, daß Kongreßmaischen $\frac{1}{2}$ Stunde im Wasserbad (100°), im Kochsalzbad (108°) und im Chlorcalciumbad (116°) gekocht wurden. Auf 12%ige Wurzeln berechnet ergaben sich folgende Werte (mg in 100 ccm)

Temp.	koagulierbarer N	koagulierter N
100°	8,00	1,60
108°	6,62	2,98
116°	6,39	3,21

Die Erhöhung der Temperatur von 100° auf 108° hat folglich nahezu zu einer Verdopplung des koagulierten Eiweißes geführt, während eine weitere gleichgroße Temperatursteigerung nur mehr verhältnismäßig wenig Eiweiß koagulierte.

b) Das Abläutern; die Treber.

Bei der Trennung von Würze und Treber stellt das Abläutern der Vorderwürze kein Problem dar. Interessant werden die Verhältnisse dagegen beim Anschwänzen, weil hier eine Reihe von Faktoren physikalischer Art (Verdünnung, Änderung der Löslichkeitsverhältnisse) und chemischer Art (z. B. Brauwasserzusammensetzung) auf die Zusammensetzung der Nachgußwürzen Einfluß nehmen können.

Auf Anregung des Verfassers führte Schild (149) an Praxissuden in Münchener Brauereien eine eingehende Untersuchung darüber durch, wie sich im Laufe des Anschwänzens die Zusammensetzung des Würzextraktes ändert. Aus dem umfangreichen Zahlenmaterial sei hier nur ein die Stickstoffverhältnisse betreffender Auszug gebracht. Helle Würze während des Abläuterns.

	Vorderwürze			Nachgußwürzen			Glattwasser		
Extrakt % Plato	16,59	11,75	7,95	5,56	3,82	2,48	1,62	1,14	0,74
in 100 g Extrakt sind enthalten:									
mg Gesamt-N	804,0	806,7	857,9	907,7	921,7	103,2	113,6	125,0	138,0
mg koagul.									
bar. N	72,7	74,1	109,3	109,7	94,8	145,6	159,5	187,8	156,8
mg dauernd									
lösl. N	731,3	732,6	748,6	798,0	826,9	886,8	976,1	106,3	123,1
mg Tannin-N	237,1	258,1	255,7	290,1	295,7	348,2	424,7	478,7	505,1
mg Phosph.									
molybd. N	340,8	335,1	371,2	412,1	408,6	506,0	635,1	685,7	776,3
mg Formol-N	300,7	312,8	314,8	312,9	306,6	308,6	328,9	341,6	339,4

Menge und Art der Stickstoffverbindungen verändern sich im Laufe des Anschwänzens und zwar steigt der gesamtlösliche Stickstoff des Extraktes mit zunehmender Verdünnung in immer stärkerem Maße an und erreicht im Glattwasser 173% seines ursprünglichen Wertes in der Vorderwürze. Zieht man die Stickstoffwerte der Vorderwürze von jenen des Glattwassers ab, so eliminiert man dadurch die rein mechanische auswaschende Wirkung des Anschwänzwassers und der Rest vermittelt ein Bild von der zusätzlichen, substanziellen Lösung des Nachgußwassers. Folgende Tabelle gibt einen Vergleich der prozentualen Zusammensetzung von Vorderwürzeeiweiß und von durch Anschwänzwasser zusätzlich gelöstem Eiweiß.

fahren von Jakob (152)). Hinsichtlich des Einflusses der Menge des Anschwänzwassers erbrachten die Versuche von Kolbach und Rehberg die gleichen Ergebnisse wie jene von Schild. Bei einem Vergleich der Wirkung von destilliertem, schwach gesäuertem oder alkalisch gemachten Anschwänzwasser zeigte sich, daß alkalische Wässer vor allem den Gehalt an Gesamtstickstoff und hochmolekularem Stickstoff in den Nachgußwurzeln erhöhen, während neutrales oder gesäuertes Wasser nur geringfügigere Unterschiede erkennen lassen. Damit ist erneut die Tatsache bestätigt, daß der Zusammensetzung des Anschwänzwassers besondere Aufmerksamkeit zu schenken ist, unseres Erachtens noch größere, als dem Einmischwasser.

Kolbach und Rehberg beschäftigen sich in diesem Zusammenhang auch mit der Frage, wie sich Wässer gleicher Alkalität, die jedoch von verschiedenen Alkalitätsträgern verursacht wird, beim Anschwänzen verhalten. Es kamen folglich 3 Wässer von der gleichen Alkalität, nämlich 7,15 ccm n/10 Säure pro 100 ccm und dem gleichen pH = 7,3 zur Verwendung mit dem Unterschied, daß das eine Calciumbikarbonat, das andere Magnesiumbikarbonat und das letzte Natriumbikarbonat enthielt. Während sich die Ca- und mg-Bikarbonatwässer hinsichtlich der Lösung der Stickstoffverbindungen kaum unterschieden, bringt das Natriumbikarbonatwasser fast 20% hochmolekularen, durch Magnesiumsulfat fällbaren Stickstoff mehr als die beiden Erdalkaliwässer in Lösung. Auch hinsichtlich der Lösung anderer hier nicht unmittelbar interessierender Bestandteile erweist sich ein Natriumbikarbonatwasser als Anschwänzwasser als ungünstiger und von stärkerer Wirkung als Erdalkalibikarbonatwässer der gleichen Alkalität. Da pH und Alkalität jeweils die gleichen waren, muß dem einwertigen Na-Jon eine im Vergleich zum Ca- und Mg-Jon bevorzugte physikalisch-chemische und kolloidchemische Wirkung zugeschrieben werden, die sich in einer Begünstigung der Löslichkeitsverhältnisse auswirkt.

Kolbach und Rehberg stellten schließlich in subtilen kritischen Versuchen, in welchen die pH-Verhältnisse besondere Berücksichtigung fanden, noch fest, daß durch alkalischwirkende Anschwänzwasser der Gehalt der Wurzeln an koagulierbarem Stickstoff erhöht wird.

Wenn man die verschiedenen referierten Befunde zusammenfaßt, so kann man die allgemeine Folgerung ziehen, daß eine zusätzliche Lösung von Stickstoff beim Anschwänzen unerwünscht ist, da vorzugsweise hochmolekularer, die Instabilität und die Neigung zu Trübungen fördernder Stickstoff gelöst wird.

Es ist deshalb verständlich, daß man sich in der Praxis seit langem bemühte, die schädliche Auslaugung der Treber möglichst hintanzuhalten, wozu eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung stehen, auf die nur kurz hingewiesen werden soll. Bekannt ist die schonende Behandlung der Spelzen im Maischprozeß (Verfahren mit sortiertem Schrot), ferner Verwendung möglichst gut enthärteter, eventuell mit Gips im Verhältnis 1 Karbonat- zu 3 Gipshärte korrigierter Wässer. Noch vorteilhafter ist eine Säuerung des Anschwänzwassers derart, daß sich das pH der Nachgußwürzen während des Anschwänzens überhaupt nicht verändert.

Schließlich sind in letzter Zeit auch Verfahren zur Veredelung der Nachgüsse bekannt geworden, welche auf einer Behandlung der Würzen mit Aktivkohle (z. B. 50—100 g Purocarbon je hl) beruhen. Hierüber berichten Moraye (153), Chabot (154), Wellhoener (155) und besonders Enders und Novak (156). Während die erstgenannten Autoren sich mit der Adsorptionswirkung der Kohle auf Würze und Bier befassen, verfolgten Enders und Novak die Wirkung der Aktivkohle auf Nachgußwürzen. Von den vielen analytischen Befunden interessiert hier vor allem die Feststellung, daß durch die Adsorptionsbehandlung der hochmolekulare, instabile Stickstoff sehr weitgehend entfernt wurde, wie sich durch vergleichende Ammonsulfattitrationskurven vor und nach der Adsorption nachweisen ließ. Der Geschmack einer auf die Konzentration der Vorderwürze eingedampften, veredelten Nachgußwürze ist völlig rein und süß und unterscheidet sich sinnfällig von dem unfeinen, kratzigen Geschmack einer gleichweit eingedampften, unbehandelten Nachgußwürze.

Die Treber.

Der Rohproteingehalt der Treber auf frische, getrocknete und Trebertrockensubstanz bezogen, ist durchschnittlich folgender:

	frisch	getrocknet	Trockensubstanz
Wasser	76,3 %	9,0%	0 %
Rohprotein	6,63%	25,5%	28%
verdauliches Rohprotein	4,74%	18,2%	20%

Während der Rohproteingehalt der Gerstentrockensubstanz etwa 10—12% beträgt, hat sich in den Trebern das Rohprotein wesentlich angereichert, sodaß das Nährstoffverhältnis von Stärkewert zu Protein wesentlich enger und damit der Futterwert günstiger geworden ist. In den Trebern befinden sich die Proteine der Gerste, welche weder im Mälzungs- noch im Maischprozeß in lösliche Stick-

stoffverbindungen abgebaut wurden also vor allem große Anteile von Hordein und Glutelin, daneben auch Globulin (Edestin), für dessen Lösung der Salzgehalt von Malz und Brauwasser nicht ausreichte und schließlich durch Hitzewirkung beim Maischen und Maischekochen koagulierte Eiweißstoffe (Albumin und teilweise Globulin), sowie unlösliche Eiweiß-Gerbstoff- (Spelzengerbstoff)-verbindungen.

c) Das Würzekochen.

Das Kochen der Würze mit Hopfen dient verschiedenen Zwecken, nämlich der Konzentration, der Sterilisierung der Würze, der Vernichtung der Enzyme, der Lösung und Umwandlung der Hopfenbittersäuren und der Ausfällung gelöster, koagulierungsfähiger Eiweißstoffe. Im Zusammenhang mit unseren Betrachtungen interessiert in erster Linie der zuletzt genannte mit der Abscheidung koagulierbaren Stickstoffs verbundene Zweck. Außerdem treten die Stickstoffverbindungen mit den Gerbstoffen vornehmlich des Hopfens in Reaktion, ferner spielen sie eine Rolle bei der Adsorption von Bitterstoffen und schließlich geben sie ähnlich wie beim Darren Veranlassung zum Eintreten der Melanoidinreaktion.

1. Koagulation der Proteine.

Wenn man in einer 10%igen Würze vor dem Kochen 6—12 mg, nach dem Kochen 1—3 mg koagulierbaren Stickstoff in 100 ccm feststellt, so ist die Differenz von 3—10 mg ausgeschiedener Stickstoffmenge quantitativ nicht, qualitativ jedoch sehr bedeutend, da es sich gerade um hochmolekularen, instabilen Stickstoff handelt, der nach den jüngst gemachten Erfahrungen und Erkenntnissen besonders zu Trübungen (Kälte-Metall-Pasteurisirertrübung) Anlaß geben und die Stabilität des Bieres gefährden kann, weshalb an seiner möglichst vollständigen Entfernung großes, praktisches Interesse besteht.

Die Theorie der Hitzedenaturierung und Koagulation der Eiweißkörper wurde bereits im Allgemeinen Teil A gebracht, worauf verwiesen sei.

Früher vertrat man die Anschauung (siehe Brauereilexikon), daß ein etwa 1 stündiges Kochen genüge, um die ausscheidbaren Eiweißkörper aus der Würze zu entfernen und daß es genüge, wenn die Würze nach dem Kochen guten Bruch und feurigen Glanz zeige. Durch die Einführung von Zusatzkochapparaten und die Intensivierung des Würzekochens ist es aber möglich geworden, die Menge der Trubabscheidung wesentlich zu steigern, sodaß normales Würzekochen nicht die maximalen Bedingungen erreichen läßt.

Die Ausfällung des koagulierbaren Stickstoffs beim Würzekochen wird durch eine Reihe von im Folgenden näher zu betrachtenden Faktoren beeinflusst.

Das pH. Ganz allgemein erfolgt optimale Koagulation der Proteine bei ihrem isoelektrischen Punkt. In Würze liegen verschiedene Eiweißstoffe vor, welche verschiedene isoelektrische Punkte aufweisen, z. B. das Leucosin mit I. P. = pH 4,7 und die Globulinkomponenten mit I. P. bei pH 4,9 bis 5,7. Dazu kommt noch hinzu, daß nach Hartong (157) Edestin, welches in der Würze als Edestinsalz vorliegt, beim pH der Würze praktisch überhaupt nicht zum Koagulieren gebracht werden kann. Andererseits berichten neuerdings Säverborn, Danielsson und Svedberg (Sandegren (4)), daß Würzekochen eine völlige Entfernung der Gerstenglobuline bewirkt. Jedoch enthält die Würze noch hochmolekulare Stickstoffverbindungen aber in so geringer Menge, daß es bisher noch nicht möglich war, über diese Verbindungen durch Ultrazentrifugenversuche exakte Angaben zu erhalten.

Infolge des Eintretens von Adsorptionsverbindungen oder kolloider Symplexe mit Kieselsäure oder anderen Kolloiden z. B. Hopfenbitterstoffen tritt das Eiweiß in der Würze als kompliziert zusammengesetzte kolloide Mizelle auf, für deren Stabilität und Ausscheidbarkeit andere Verhältnisse gelten mögen als sie für reine Proteine zutreffen. Für Betriebsvorderwürze fanden Windisch, Kolbach und Vogel (158), ferner Kolbach und Wilharm (159) das optimale pH der Koagulation bei 6 bis 6,5 wie folgende Tabelle zeigt:

Vorderwürze pH 6,60	koagulierter Stickstoff	7,11
5,76		7,75
5,14		7,20
4,59		6,38
7,12	koagulierter N in % des	90
6,49	maximal koagulierb. N.	100
5,66		93
4,66		79
4,01		69

Diese für die Vorderwürze gültigen Verhältnisse verschieben sich, sobald man die mit den Nachgußwürzen vereinigte Pfannevollwürze untersucht. Für diese liegt das Koagulationsoptimum bei pH 5,2—5,5. Lüers (160) fand als Optimum der Koagulation pH 5,0—5,3, während Hopkins (161) zwischen pH 4,6 und 5,6 fast keine Unterschiede an der Menge des ausgeschiedenen Eiweißes für englische

Würzen beobachtete. Wir beobachten somit von der Vorderwürze zur Ausschlagwürze eine Verschiebung des Koagulationsoptimums von pH 6 bis pH etwa 5. Die Ursachen hierfür sind im Einzelnen noch nicht experimentell erforscht. Sie können durch die oben gegebenen Erklärungen gedeutet werden.

Die Konzentration der Würze.

Kutter und Siegfried (162) und Kolbach und Wilharm (163) beobachteten eine Zunahme des koagulierten Stickstoffs mit abnehmender Würzekonzentration, weshalb hochprozentige Würzen eine längere Kochdauer als niedrigprozentige erfordern, um den gleichen Grad der Stickstoffausscheidung zu erreichen. Vermutlich tragen die höhere Viscosität und der höhere Gehalt an Schutzkolloiden an dieser Erscheinung die Schuld.

Kochdauer.

Nach Kutter (164) tritt mit zunehmender Kochzeit eine Vermehrung der unlöslichen Trubrockensubstanz und ihres Proteingehaltes ein. Kolbach und Wilharm (165) fanden, daß in den ersten 25 Minuten des Kochens die Eiweißausscheidung am stärksten ist, sodaß ein bestimmter Teil des koagulierbaren Stickstoffs besonders leicht abzuscheiden ist. Mit verlängerter Kochzeit steigt die N-Ausscheidung weiterhin langsam an, erreicht aber selbst bei 5stündiger Kochdauer noch nicht ihr Ende. Durch die Hopfengabe gelangt löslicher Stickstoff in die Würze, der die Menge des koagulierten Stickstoffs ausgleicht, manchmal sogar überkompensiert, was analytisch zu berücksichtigen ist.

Kochintensität.

Die Kochintensität wird am besten durch die stündlich verdampfte Wassermenge definiert. Zur Intensivierung des Kochens finden Zusatzkochapparate Verwendung z. B. der bekannte Perfektapparat. Horch und Schultheis (166) fanden bei Zusatzkochung im Vergleich zu normaler Dampfkochung eine Vermehrung der Trubausscheidung um 10—20%. Nachdem die Koagulation ein kolloidchemischer Vorgang ist, wird es verständlich, daß intensive Kochung mit reichlicher Dampfblasenentwicklung, ihren Oberflächen und ihrer rührenden Bewegung zu einer Förderung der Koagulation führt. Daß gerade der Dampfblasenentwicklung eine wichtige Bedeutung zukommt, zeigt auch die Tatsache, daß ein Druckerhitzen der Würze auf 105—107° zwar die N-Ausscheidung etwas erhöht, jedoch nicht in dem erwarteten Maße, was darauf beruht, daß die Würze nur

anfänglich bis zur Erreichung der genannten Temperaturen kocht und dann die Dampfblasenbildung aufhört.

Der wichtige Einfluß der Kochintensität auf die Eiweißkoagulation wurde von Kolbach und Wilharm (165) analytisch dazu ausgenützt, aus dem Gehalt der Ausschlagwürze an noch koagulierbarem Stickstoff ein Urteil über die Kochwirkung in ihrer Gesamtheit zu fällen. Zu diesem Zweck wird die filtrierte Ausschlagwürze 5 Stunden unter Rückflußkühlung im gesättigten Salzbad gekocht und das Koagulum nach Kjeldahl verascht. Auf 12%ige Würzen berechnet enthalten die Ausschlagwürzen je nach der Kochintensität zwischen 1 und 3 mg koagulierbaren Stickstoff in 100 ccm.

2. Eiweiß und Gerbstoff.

Außer dem Eiweiß sind in der Würze Gerbstoffe enthalten und zwar aus den Spelzen und aus dem Hopfen herkommend. Gerbstoffe sind, wie im allgemeinen Teil bereits erwähnt wurde, dazu befähigt, mit Eiweißkörpern (und deren höheren Abbauprodukten) unlösliche Verbindungen einzugehen. Die Eigenschaften der Eiweiß-Gerbstoffverbindungen werden von der Art der Gerbstoffe beeinflusst. Der Hopfengerbstoff in seiner natürlichen Form liefert mit Eiweißstoffen der Würze in der Hitze lösliche, beim Abkühlen sich unlöslich abscheidende Verbindungen. Der durch Sauerstoff oxydierte Hopfengerbstoff, Phlobaphen genannt, geht mit den Würzeiweißkörpern in der Hitze und in der Kälte unlösliche Verbindungen ein. Durch die Gegenwart von Gerbstoffen findet also eine zusätzliche, über die Hitzekoagulierung hinausgehende Ausscheidung von Würzeiweiß statt und gleichzeitig werden aber auch infolge der eigenartigen Löslichkeitsbedingungen der Eiweiß-Gerbstoffverbindungen die Bedingungen zum Eintreten von unangenehmen Trübungen, wie Kälte- und Pasteurisirtrübung geschaffen. Aus diesen Gründen kommt, wie so oft im Werdegang des Bieres, solchen Verbindungen, die mengenmäßig eine ganz untergeordnete Rolle spielen in qualitativer Beziehung große Bedeutung zu.

In neuerer Zeit haben Lüers und Niedermaier (167) die Reaktion des Hopfengerbstoffs mit Eiweißkörpern mit Hilfe einer sehr empfindlichen nephelometrischen Methode unter verschiedenen Gesichtspunkten studiert.

Menge des Eiweißes.

Werden jeweils gleiche Mengen Hopfenauszug mit steigenden Mengen Albumin gekocht, so werden zwar steigende Mengen von Gerbstoff gebunden, jedoch herrscht zwischen Eiweiß- und Gerbstoff-

menge keine Proportionalität, sondern es liegt, wie besonders die graphische Darstellung erkennen ließ, eine nach den Gesetzen der Adsorption verlaufende Bindung vor, d. h. kleine Eiweißmengen nehmen relativ viel Gerbstoff auf, größere Mengen Eiweiß dagegen relativ immer weniger. Unter normalen, in der Praxis des Würzekochens obwaltenden Bedingungen wird niemals der Gerbstoff restlos aus der Würze ausgeschieden, denn es stellt sich das von den gegenseitigen Konzentrationen von Gerbstoff und Eiweiß bedingte Adsorptionsgleichgewicht ein.

Der Einfluß der Temperatur auf die Gerbstoffbindung ist ein bedeutender. Unter vergleichbaren Bedingungen bindet die gleiche Menge Eiweiß bei 95° nahezu die doppelte Menge Gerbstoff als bei 20°. Das in der Würze vorkommende Edestin bindet den Hopfengerbstoff etwa in den gleichen quantitativen Verhältnissen als das Albumin. Wurde der Hopfengerbstoff durch 20 Minuten langes Lüften oxydiert, so war die Gerbstoffbindung durch das Edestin, wie folgende Tabelle zeigt, eine wesentlich stärkere.

				Normaler	Oxydierter	
				Hopfenauszug	Hopfenauszug	
25 ccm Hopfenauszug + 0 ccm 0,6%ige Ede-						
stinlös.				2,80%	2,70%	Gerbst.
25	„	+	1	„	2,07%	1,37%
25	„	+	2	„	1,73%	0,65%
25	„	+	3	„	1,16%	0,33%
25	„	+	4	„	1,12%	—
25	„	+	6	„	0,96%	0,16%
25	„	+	10	„	0,60%	
25	„	+	15	„	0,27%	

Hartong (168) machte ebenfalls die Beobachtung, daß Oxydation zur besseren Ausscheidung des Gerbstoffs führt und erblickt eine weitgehendere Gerbstoffausscheidung unter dem Einfluß von Zusatzkochapparaten in einer gesteigerten Oxydation des Gerbstoffs.

Wie schon lange bekannt ist, hängt die gegenseitige Bindung von Eiweiß und Gerbstoff auch von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung ab. Auch für die Eiweißkörper des Malzes und den Hopfengerbstoff ergab sich diese Tatsache, wie folgende Versuche zeigen:

folgende Versuche zeigen:					pH 5	6	7	
25 ccm Hopfenauszug + 0 ccm Malzauszug					3,10	3,10	3,10%	Gerbstoff
25	"	"	+ 2	"	2,46	2,64	2,68%	"
25	"	"	+ 4	"	1,89	2,06	2,24%	"
25	"	"	+ 6	"	1,48	1,68	2,01%	"

Mit zunehmender aktueller Azidität erfolgt also eine stärkere Bindung des Gerbstoffs an das Eiweiß. Eine Erklärung für dieses Verhalten findet man am besten in den elektrischen Ladungsverhältnissen der Reaktionspartner. Die Gerbstoffe sind ausgesprochen negativ geladen, infolgedessen verbinden sie sich, besonders wenn diese Bindung adsorptiv erfolgt, mit positivem Eiweiß. Da der isoelektrische Punkt der Würzeiweißkörper (Pfannevollwürze) etwa zwischen pH 5,2 und 5,5 liegt, ist es verständlich, daß bei einem pH von 5 und noch niedriger, wo das Eiweiß erst ausgesprochen positive Ladung annimmt, die Bindung des Gerbstoffs an das Eiweiß eine bessere werden muß.

Die Zeitdauer, während welcher die Reaktion zwischen Eiweiß- und Gerbstoff von statten gehen kann, erweist sich nach folgenden Versuchen ebenfalls von Einfluß.

Gerbstoffgehalt nach Minuten

	0	3	15	30	60
25 ccm Hopfenausz. + 0 ccm Malzausz. 3,10	—	—	—	—	—
25 „ „ + 2 „ „	1,99	1,80	1,73	1,69	
25 „ „ + 6 „ „	1,20	0,96	0,93	0,88	

Je länger demgemäß Eiweiß und Gerbstoff aufeinander einwirken, desto mehr Gerbstoff wird von dem immer vollständiger koagulierenden Eiweiß gebunden. Mit Rücksicht auf die praktischen Verhältnisse, nämlich den Zeitpunkt der Hopfengabe, war es von Interesse festzustellen, ob zwischen dem in der Koagulation befindlichen und dem bereits auskoagulierten Eiweiß-Unterschiede hinsichtlich der Gerbstoffbindung bestehen. Der Versuch wurde so durchgeführt, daß einmal Malzauszug, so wie er war, das andere Mal Malzauszug, in welchem durch 20 Minuten langes Erhitzen der größte Teil der Eiweißkörper zur Koagulation gebracht worden war, mit Hopfenauszug 20 Minuten erhitzt wurde. Im ersten Fall wirkte also das in der Koagulation befindliche Eiweiß im zweiten Fall das bereits auskoagulierte Eiweiß auf den Hopfengerbstoff ein. Das Ergebnis war folgendes:

nicht koagul. koaguliert

	nicht koagul.	koaguliert	Gerbstoff
25 ccm Hopfenauszug + 0 ccm Malzauszug	3,15	3,15	Gerbstoff
25 „ „ + 1 „ „	2,70	2,76	„
25 „ „ + 2 „ „	2,29	2,55	„
25 „ „ + 4 „ „	1,76	2,16	„
25 „ „ + 6 „ „	1,46	1,89	„

Der Erfolg ist, daß das in der Koagulation begriffene Eiweiß deutlich mehr Hopfengerbstoff aus der Lösung herausnimmt, als das bereits koagulierte. Je früher der Hopfen der Würze zugesetzt wird und je länger er mitkocht, desto mehr an Gerbstoff wird also ausgeschieden. Auch Hartong (loc. cit. 168) fand bei seinen Gerbstoffbilanzversuchen, daß bei Teilgaben des Hopfens mehr Gerbstoff in der Würze verbleibt, als bei einmaliger Hopfengabe zu Beginn des Kochens. Betrachtet man die Verhältnisse beim Hopfenkochen von der Eiweißseite aus, so wird wie Kolbach (169) und Kolbach und Wilharm (loc. cit. 165) feststellten, auch umsomehr Eiweiß ausgeschieden, je länger der Hopfen mit der Würze mitgekocht wird. Damit kommt die eiweißfällende Wirkung des Hopfengerbstoffs deutlich zum Ausdruck. So wurde z. B. bei einmaliger Hopfengabe zu Beginn des Kochens und bei mehreren Teilgaben, die sich mehr gegen das Ende des Kochens zu verschoben, in der Ausschlagwürze 0,89 bzw. 1,69 mg koagulierbarer Stickstoff gefunden. Auch Kutter (loc. cit. 164) konnte in seinen ausführlichen Studien über die Trubausscheidung und das Verhältnis von Grobtrub zu Feintrub mehrfach auf die Bedeutung des Hopfens und die Art seiner Gabe auf Menge und Art des Trubes hinweisen. Lüers, Krauß, Hartmann und Vogt (loc. cit. 142) fanden bei Infusionssuden, bei denen einmal der gesamte Hopfen zu Beginn des Kochens, ein andermal $\frac{2}{3}$ des Hopfens erst nach erfolgter Bruchbildung gegeben wurden, 26,9 bzw. 24,9 in einem anderen Jahr 22,8 bzw. 18,8 kg Trubtrockensubstanz. Damit ist auch durch Praxisversuche für die Eiweißfällung die bereits oben für den Gerbstoff erörterte Tatsache erwiesen, daß ein Unterschied besteht, ob der Gerbstoff mit dem koagulierenden oder bereits koagulierten Eiweiß in Reaktion tritt, zugleich zeigt dieser Versuch, daß der Hopfengerbstoff eiweißfällend wirkt.

Eine noch ungenügend geklärte Frage ist die, ob der Hopfengerbstoff mit verschiedenen hochmolekularen Stickstoffverbindungen gleich stark zu reagieren vermag. Hopkins-Krause (loc. cit. 98) zitieren Versuche Schjernings, denen zufolge sein Albumin I (Leucosin) vollständig durch kleine Hopfenmengen gefällt wird, während das Albumin II (Edestin) nur teilweise, auch bei großen Hopfengaben zu fällen ist. Auch höhere Eiweißabbauprodukte können vom Gerbstoff gefällt werden. Das steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Fink und Wildner (loc. cit. 134), wonach Gerbstoffe nicht selektiv nur etwa hochmolekulares, koagulierbares Eiweiß, sondern auch Albumosen und Peptone zu fällen vermögen. Gerade derartige hochmolekulare, nicht mehr koagulierbare Stickstoffverbindungen müssen

es aber sein, welche nach ihrer Vereinigung mit dem Hopfengerbstoff zwar noch löslich, aber doch so wenig stabil geworden sind, daß sie später zu Trübungen im Bier Anlaß geben können. Dafür spricht die Erfahrung, daß man zur Stabilisierung von Übersee-Exportbieren größere Tanninmengen braucht als man sie zur Abscheidung des koagulierbaren Stickstoffs benötigen würde.

Wenn man von höheren Abbauprodukten der Eiweißstoffe spricht, meint man damit im allgemeinen eine Gruppe von Verbindungen, die man mit dem Begriff Albumosen bezeichnet. Sie sind am besten dadurch zu definieren, daß sie beim Kochen nicht mehr koagulieren. Über ihr Molekulargewicht ist damit aber nichts ausgesagt. Das Albumin, Leucosin, das leicht koaguliert, hat z. B. ein Molekulargewicht von 35 000, während Abbauprodukte des Globulins Edestin ein solches von 45 000 haben können und trotzdem, wie Hartong (loc. cit. 157) nachwies, nicht koagulieren. Gerade diese „Globulosen“ aber sind es, welche mit Gerbstoffen zusammen Trübungen in Form von Kühltrübungen der Würze und Kältetrübungen des Bieres hervorrufen.

Auch der Dispersitätsgrad der Stickstoffverbindungen erfährt nach kolloidchemischen Untersuchungen, die Windisch, Kolbach und Wentzel (116) mit Hilfe der Ultrafiltrationsmethode anstellten, eine Veränderung im Sinne einer Vergrößerung, wie folgende Tabelle beweist:

Stickstoff	Würze ohne Hopfen mit Hopfen gekocht	
dauernd löslich	687	701
dauernd lösl. — 1½%iges Ultrafiltrat	78	145
1½—3%iges Ultrafiltrat	26	17
3—4½%iges	65	7
4½—6%iges	68	67
6—7½%iges	33	34
im 7½%igen	417	431

Die Werte für den dauernd löslichen Stickstoff zeigen, daß der Hopfen etwas mehr an Stickstoff in die Würze brachte, als durch das Hopfenkochen daraus entfernt wurde. Die Fraktion „3—4½“ ist fast verschwunden, die Fraktion „dauernd löslich — 1½“ hat eine bedeutende Steigerung erfahren. Der Hopfengerbstoff hat also deutlich dispersitätsgradvergrößernd gewirkt.

Die bisherigen Ausführungen befassen sich ausschließlich mit dem Hopfengerbstoff und seiner Wirkung auf die Eiweißstoffe. Doch kommen in der Würze auch aus der Gerstenspelze herstammende Gerbstoffe vor. Mit diesen hat sich Hartong (l. c. 168) befaßt. Mit

Hilfe der Löwenthal'schen Hautpulver-Permanganatmethode stellte er über die eiweißfällende Wirkung von Malz und Hopfengerbstoff Bilanzversuche an. Aus diesen ergab sich, daß die gerbende Kraft des Malzgerbstoffes gegenüber den Würzestickstoffverbindungen sich wie 1 : 0,5 verhielt, während das gleiche Verhältnis für den Hopfengerbstoff 1 : 0,8 bis 1,21 betrug, sodaß dem letzteren eine größere gerbende Kraft zukommt.

Wie bereits erwähnt, sind die Eiweiß-Gerbstoffverbindungen auch die Ursache für die Kältetrübung und die Oxydationstrübung des Bieres. Dieser wichtige Komplex von Erscheinungen wird bei späterer Gelegenheit noch ausführlich behandelt werden.

Hier soll nur noch kurz darauf hingewiesen werden, daß eine mehr oder weniger große Ausschaltung des Hopfengerbstoffes beim Würzekochen einerseits durch das von Stadler und Reidt (170) studierte Hopfenbrühen, andererseits durch das von F. Windisch (171) empfohlene Extrahieren gemahlenen Hopfens mit kaltem Wasser und Zugabe des mit Aktivkohle behandelten Extraktes zur Maische möglich ist. Durch derartige Maßnahmen werden außer geschmacklichen Verbesserungen und Herabsetzung der Neigung von Würze und Bier zu Trübungen, auch Farbaufhellungen erreicht.

3. Eiweiß und Hopfenbitterstoffe.

Das beim Würzekochen auskoagulierende oder auch als Gerbstoffverbindung ausgeschiedene Eiweiß besitzt eine adsorbierende Fähigkeit auf die beim Hopfenkochen sich bildenden Umwandlungsprodukte der Hopfenbitterstoffe. Nachdem nun sowohl die Trubbildung, wie auch die Umwandlung der Bitterstoffe von verschiedenen äußeren Faktoren wie pH, Kochintensität, Konzentration der Würze abhängen, wird das Ausmaß der Adsorption und damit der Bitterstoffgehalt der Würze ein verschiedener sein. Kolbach und Kleber (172), welche sich eingehend mit den Kochveränderungen der Bitterstoffe unter Aufstellung von Bilanzen befaßten, fanden, daß ebenso wie die Gesamtbitterstoffe auch nicht abgebautes Humulon um so mehr zur Adsorption an den Trub gedrängt werden, je saurer die Würze ist. Die Verhältnisse treten klar in Erscheinung, wenn man die nach dem Kochen wieder gefundenen Gesamtbitterstoffe in Würze und ebenso im Trub = 100 setzt und das nicht umgewandelte Humulon in beiden Fällen in Prozent der Gesamtbitterstoffe ausdrückt:

Humulon

pH vor dem Kochen	in % der in Würze wieder- gefund. Ges.-Bitterst.	in % der im Trub wiedergef. Ges.- Bitterstoffe
5,26	39,8	65,3
5,57	36,8	53,1
5,85	34,4	45,1

Es ist daraus ersichtlich, daß der Trub bei weitem mehr unabgebautes Humulon enthält als die Würze und daß mit fallendem pH. also zunehmender Azidität wesentlich mehr Humulon in den Trub gedrängt wird. Hohe Aziditäten in der Würze (Säuerung, weiches Wasser) verzögern die Kochumwandlung des Humulons und führen zu hohen Humulonverlusten durch dessen Bindung an den Trub. Auch der verschiedenen hohe Gerbstoffgehalt der Hopfen kann über die von ihm bewirkte unterschiedlich große Trubbildung zu verschiedener Bitterstoffadsorption Anlaß geben und sich damit in geschmacklicher Beziehung auswirken.

Infolge der adsorptiven Bindung von Bitterstoffen an den Trub, überhaupt an Kolloide, ist zu erwarten, daß die Entfernung von Bitterstoffen aus der Würze um so größer sein wird, je mehr koagulierbares Eiweiß in einer Würze enthalten und beim Kochen ausgeschieden wird. Nach Kolbach (173) ließ sich dies durch Versuche mit Würzen von verschieden hohem Gehalt an koagulierbarem Stickstoff und gleicher Hopfengabe (300 g/hl) bei gleicher Kochzeit (2^h) bestätigen, wie folgende Tabelle zeigt:

100 ccm Würze enthalten	Bitterstoffe in	Bitterstoffe im Bier	
mg koag. N vor Kochen	gekocht. Würze	mg/L	in % der an-
	mg/L		gewandten
13,2	116,8	72,4	14,3
7,2	142,7	84,1	19,6
0,9	159,5	100,5	19,8

Die erste Würze entspricht einer Infusions-, die zweite einer Dekoktionswürze. Man erkennt, wie mit Abnahme des koagulierbaren Stickstoffs der Bitterstoffgehalt in der Würze ansteigt und dieser Anstieg auch im Bier noch wahrnehmbar ist. Es ist klar, daß sich dies auch geschmacklich äußern muß. Auch erklärt sich daraus die Tatsache, daß hochprozentige Würzen mit ihrem höheren Gehalt an koagulierbarem Stickstoff höhere Hopfengaben als schwächer prozentige erfordern, um die gleiche Bittere zu zeigen.

Auch die höhere Hopfengabe bei Intensivierung des Würzekochens mit Zusatzapparaten findet auf gleiche Weise ihre Erklärung.

Will man eine kräftigere Bittere und eine bessere Ausnützung der Hopfenbitterstoffe erreichen, so kann man daran denken, die Würze zuerst bis zur Bruchbildung zu kochen und dann erst den Hopfen zuzusetzen. Windisch, Kolbach und Vogl (loc. cit. 174) fanden im Trub folgende Bitterstoffmengen je nach der Art des Kochens:

Bei Humulongabe zu Beginn des Kochens	20,8	26,9
„ „ nach 1stünd. Kochen	11,6	21,3
	pH 5,23	pH 4,63

Es wird also bei einem der Würze nahekommenden pH von 5,23 fast doppelt so viel an Bitterstoffen an den Trub adsorbiert, wenn der Hopfen von Anfang an mitkocht und damit die Bitterstoffe Gelegenheit haben mit dem koagulierbaren Eiweiß zu reagieren, als wenn die Hopfengabe erst nach der Bruchbildung erfolgt. Allerdings ist dabei noch zu berücksichtigen, daß eine spätere Hopfengabe infolge der damit verbundenen kürzeren Kochzeit in der Praxis eine geringere Umwandlung des Humulons zur Folge hat, dafür geht weniger Bitterstoff in den Trub. Spätere Hopfengabe nach der Bruchbildung läßt auch mehr Hopfengerbstoff in der Würze, sodaß sich insgesamt eine Reihe antagonistischer Vorgänge abspielen, die eine sichere Beurteilung des Einflusses der Art der Hopfengabe nur an Hand von Versuchssuden zulassen.

Im Rahmen dieser Betrachtungen verdient auch ein Verfahren der Protexgesellschaft (175) Erwähnung, das dadurch eine Hopfenersparnis erreicht, daß Würze ohne Hopfen $\frac{1}{2}$ –1^h gekocht wird, dann als Adsorptionsmittel Montmorillonit zugegeben und weiter 10–15 Minuten gekocht wird, wodurch instabile Eiweißkörper durch selektive Adsorption gebunden werden. Dann erfolgt das Hopfenkochen. Außer der Ersparnis an Hopfen sollen durch diese Arbeitsweise auch eiweißstabile, pasteurisierfähige Biere erhalten werden.

4. Würzekochen und Melanoidinreaktion.

Sowohl Gray, Stone und Rothchild (176) als auch Hartong und Luder (177) stellten beim Würzekochen eine starke Zunahme der Reduktionskraft gegenüber Redox-Indikatoren fest. Nachdem letztere Autoren zeigen konnten, daß die Reduktionswirkung beim Kochen von Glukose-Phosphatpufferlösungen bereits in Erscheinung tritt, jedoch bei Gegenwart von Glycocoll außerordentlich erhöht wird, lag der Schluß nahe, daß die Melanoidinreaktion (siehe Darren)

die Ursache für die Ausbildung reduzierender Eigenschaften beim Würzekochen sei.

Beim Darrprozeß wurde bereits erörtert, daß für das Eintreten der Melanoidinreaktion eine Triose X, die mit den Zuckern im Gleichgewicht steht und sich zu Methylglyoxal stabilisiert, verantwortlich zu machen ist. Enders (178) verfolgte nun das Reduktionsvermögen und die Farbzunahme von wässrigen Lösungen, welche 1% Methylglyoxal und 1% Glycocolle enthielten, während längerem Erhitzen im Wasserbad bei 90°. Das Reduktionsvermögen wurde in 5 ccm jodometrisch gemessen, womit in Anbetracht des niederen pH von 3,5 ebenso wie mit Tillmans Reagens ein Kriterium für die „Reduktions“-bildung zu gewinnen ist. Die Farbe wurde lichtelektrisch durch den Absorptionswert im Langekolorimeter nach Verdünnung 1:10 festgestellt. Folgende Tabelle gibt die Ergebnisse wieder:

Erhitzungszeit	1% Methylglyoxal + 1% Glycocolle	
	Braunfärbung % Absorption	Reduktionskraft ccm n/100 J ₂
0 Min.	0	0,1
1 „	0	0,2
5 „	0	0,3
10 „	1	0,4
20 „	3	0,9
30 „	6	1,3
1 Std.	15	2,1
2 „	33	2,6
3 „	47	3,0
4 „	58	3,3
5 „	67	4,6

In reinen Methylglyoxallösungen trat bei gleich langer Erhitzung keine Farbveränderung ein und das Reduktionsvermögen blieb auf dem Wert 1,1 ccm n/100 Jod stehen. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Reduktionskraft der aus Methylglyoxal und Glycocolle gebildeten Melanoidinlösung mit der Farbvertiefung parallel ansteigt. Unter intensiveren Kochbedingungen nimmt die Reduktionskraft schneller zu und erreicht 5 ccm n/100 Jod. Unter solchen Bedingungen zeigen auch die glycocollefreien Methylglyoxallösungen eine geringere Zunahme der Reduktionskraft, entsprechend den Beobachtungen Hartongs. Die Versuche haben somit eindeutig erwiesen, daß das beim Würzekochen beobachtete starke

Ansteigen des Reduktionsvermögens auf das Eintreten der Melanoidinreaktion zurückzuführen ist.

Als Nebenreaktion bei der Melanoidinbildung entsteht aus Methylglyoxal und Ammoniak bzw. Glycocoll das β -Alanin, wie ebenfalls Enders nachweisen konnte. Diese Aminosäure stellt einen Hauptbestandteil des Bioskomplexes dar. Bisher nahm man an, daß das β -Alanin durch die Gerste in das Bier gelangt. Durch diese neuen Feststellungen wurde aber erwiesen, daß sowohl das Darren, als auch das Würzekochen zur Bildung des β -Alanins führt, sodaß interessante Beziehungen zwischen Darrarbeit und Intensität des Würzekochens mit dem Hefeleben in den Bereich der Möglichkeit gerückt sind.

d) Das Kühlen der Würze.

Hauptaufgabe des Kühlens ist die Herabsetzung der Temperatur der kochend heißen Anstellwürze auf Anstelltemperatur von etwa 5°. Dabei vollziehen sich aber noch zwei Prozesse, nämlich die Aufnahme von Luftsauerstoff und die Ausscheidung und Abtrennung des Trubes.

1. Die Aufnahme von Sauerstoff.

Der Luftsauerstoff wird von der sich abkühlenden Würze auf chemischem Wege durch Oxydation von Würzebestandteilen bei hohen Temperaturen und auf mechanischem Wege durch physikalisch-chemische Absorption in der kalten Würze aufgenommen. Hier interessiert nur der chemisch gebundene Sauerstoff, da hieran auch Proteine bzw. Stickstoffverbindungen mitbeteiligt sind. Bleisch und Schweitzer (179) fanden für die einzelnen Substanzgruppen der Würze folgende Sauerstoffaufnahme.

	%	ccm Sauerstoff in 24h bei 85° gebunden
Rohrzucker	14	8
Dextrose	14	46
Laevulose	14	70
Maltose	14	40
Dextrin	7	13
Kräusseneiweiß	7	33
Pepton	7	72
Gummi	7	1
Hopfen	0,3	25

Berücksichtigt man die Konzentration, in welcher die einzelnen Bestandteile in der Würze auftreten, so treffen von der Gesamt-oxydation

auf Maltose	71,3%
auf Dextrin und Laevulose	14,5%
auf übrige Verbind.	14,2%

M. van Laer (179a) prüfte die Befunde von Bleisch und Schweitzer durch Messung der aufgenommenen Sauerstoffmengen (60° und Phosphatpuffer von pH 5,3) in der Warburgapparatur mit folgendem Ergebnis nach:

je Stunde und Gramm absorbierte Menge ccm Sauerstoff.

Maltose	23	Tannin	315
Pepton	54	Lävulose	1165
Glukose	96	Bitterharze	1940

oder auf Würze bezogen:

	g/L	ccm O ₂ in 1 ^h bei 58°
Maltose	60	1,4
Lävulose	3	3,5
Glukose	5	0,5
Stickstoff	5	0,3
Harze	0,4	0,8
Tannin	0,1	0,3
		Sa. 6,8

Metalle wie Kupfer wirken oxydationsfördernd auf Tannin, Glukose und besonders Peptone, nicht auf Maltose und Harze.

Bleisch und Schweitzer konnten zwischen der heißen Belüftung der Würze und der Trubabscheidung keinen Zusammenhang feststellen. Da aber bei hohen Temperaturen Gerbstoffe zu Phlobaphenen oxydiert werden, ist damit zu rechnen, daß die Kühltrübung damit beeinflußt wird, was Enders (180) an Modellversuchen bewies, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

2. Die Trubabscheidung.

Für die Betrachtung der Vorgänge, welche sich im Verlaufe der Trubabscheidung abspielen, ist, um Verwirrung, wie sie in der Literatur vielfach anzutreffen ist, zu vermeiden, eine klare Definition der Phaenomene erforderlich. Daß dieses Bedürfnis verschiedentlich empfunden wurde, zeigen mehrere Veröffentlichungen der

letzten Zeit, so insbesondere von F. Windisch (181), Kutter (182) und Jakob (183). Wir verstehen im folgenden unter Heißtrub jene Ausscheidungen, welche beim Hopfenkochen durch die Hitzekoagulation der Eiweißkörper teilweise unter Mitwirkung von Gerbstoffen entstanden sind und sich durch Filtration oder durch Sedimentation aus der heißen Würze abscheiden lassen. Man kann diese Art des Trubes auch Kühlschifftrub oder Grobtrub nennen, obwohl diese Begriffe nicht mehr ganz eindeutig sind. Unter Kühltrub verstehen wir jene Ausscheidungen, die sich beim Abkühlen einer heißen Würze bilden, auch wenn sie durch Filtration in der Hitze vom Heißtrub befreit war und dabei ein völlig blankes Aussehen besaß. Für diese Art von Trub trifft man auch die Bezeichnung Feintrub oder amorphe Substanz an.

Die Ausscheidung des Heißtrubes ist mit Beendigung des Hopfenkochprozesses zu Ende, dann folgt die Heißtrubabtrennung oder Separation. Die Ausscheidung des Kühltrubes beginnt etwa bei Temperaturen von 60° und ist bei Anstelltemperatur beendet. Die Temperatur, bei welcher die Kühltrübung dem Auge sichtbar in Erscheinung tritt, heißt man den Kühltrübungspunkt. Die Abtrennung des ausgeschiedenen Kühltrubes ist eine eigene Operation, die je nach den eingeschlagenen technologischen Maßnahmen vollständig oder unvollständig gelingt.

Der Heißtrub.

Die Menge des extraktfreien Heißtrubes, bezogen auf 100 hl 12%iger Würze geben Lüers und Wiedemann (183a) mit 2,5 kg, Kutter und Siegfried (184) mit 2,5 bis 4,0 kg, und Jakob (loc. cit. 183) mit 2,34 kg an. Auf 100 kg Malzschüttung kann man nach Kutter mit etwa 0,25 kg extraktfreier Trubtrockensubstanz rechnen. Selbstverständlich ist die Menge des jeweils anfallenden Trubes keine konstante Größe, sondern sie wird von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, worauf schon hingewiesen wurde. Da die Muttersubstanz des Trubes das koagulierbare Eiweiß der Hopfenkesselwürze darstellt, wird die Menge des Trubes in erster Linie von der Menge des koagulierbaren Eiweißes beeinflusst. Diese letztere hängt außer vom Eiweißgehalt des Malzes vor allem vom Maischverfahren ab. Beim Infusionsverfahren ist sie am höchsten, ihm steht das Hochkurzmaisungsverfahren nahe, während das 3-Maischverfahren oder Maischverfahren, bei welchem große Anteile der Maische gekocht werden, weniger Trub liefern. Hohe Hopfengaben erhöhen infolge des höheren Gerbstoffgehaltes die Heißtrubmenge und verschieben das Verhältnis von Heißtrub zu Kühltrub zugunsten des ersteren. Mit zu-

nehmender Kochdauer nimmt die ausgeschiedene Gesamttrubmenge zu, wobei der Zuwachs auf die Heißtrubmenge entfällt. Intensivierung des Würzekochens erhöht die Heißtrubausbeute, während die Druckkochung nach Kutter und Siegfried (loc. cit. 184) hauptsächlich die Kühltrübung vermehrt. Trub von Druckkochung her-rührend, sedimentiert im allgemeinen infolge seines höheren spe-zifischen Gewichtes rasch.

Zusammensetzung des Trubes.

Exaktere Analysen des Trubes liegen erst aus neuerer Zeit vor. Die mechanische Zusammensetzung des Trubes besteht aus koagulierten Eiweißflocken, denen je nach der Bauart des Hopfenseihers Frag-mente des Hopfens beigemischt sind. Die chemische Analyse des Trubes liefert im Durchschnitt einen Wassergehalt von etwa 80%, bei Schwankungen nach Enders und Spiegl (185) von 72,9 bis 82,8%. Der Eiweißgehalt des Naßtrubes schwankt zwischen 10,73 und 15,53%, in der Trubtrockensubstanz zwischen 49,92 und 63,08%, was mit den von Kutter und Lüers und Wiedemann angegebenen Wer-ten gut übereinstimmt. Berechnet man das Eiweiß des Trubes in Prozenten des Eiweißes des Malzes, so finden sich nach Enders und Spiegl 1,15 bis 1,34% des Malzeiweißes im Trub wieder.

Das im Trub vorhandene Eiweiß ist zum Teil in verdünnter Na-tronlauge löslich und zwar durchschnittlich 18% bei Trub aus dunk-len und 33% bei Trub aus hellen Suden. Vielleicht ist die höhere Hopfengabe und die Bildung größerer Mengen von Eiweißgerb-stoffverbindungen die Ursache für das abweichende Verhalten der Trube heller Würzen.

Einen näheren Einblick in die Natur des Heißtrubes haben Lüers und Wiedemann (186) durch eine van Slyke-Analyse zu gewinnen versucht. Die Stickstoffverteilung war folgende:

Ammoniak-N.	7,51%
Melanin-N.	1,18%
Cystin-N.	1,53%
Arginin-N.	5,30%
Histidin-N.	6,66%
Lysin-N.	5,20%
Amino-N. im Hexonbasenfiltrat	57,74%
Nicht-Amino-N. im Hexonbasenfiltrat	13,91%

Sa. 99,03%

Der Heißtrub stellt ein Gemisch von durch Kochen koagulierten Proteinen dar, denen sich noch solche, die durch Hopfengerbstoffwirkung ausfielen, zugesellten. Denn die obigen Hydrolysenresultate stimmen mit keinem der bisher untersuchten, reinen Malzproteine, wie Leucosin, Hordein, Edestin überein. Außerdem enthält der Hopfenkesselbruch immer noch größere Mengen von Mineralstoffen, darunter auffallend viel Kieselsäure, ferner Gerbstoffe, Bitterstoffe und eine Reihe anderer nicht näher bestimmter Kolloide, unter welchen möglicherweise auch Pektinstoffe, aus dem Hopfen herstammend, vertreten sind.

Daß im Trub auch Gerbstoff an das Eiweiß adsorbiert oder mit ihm chemisch gebunden vorliegen mußte, darüber waren sich viele Autoren im Klaren, ohne experimentell den Beweis durch Isolierung des Gerbstoffes in Substanz dafür erbringen zu können. Hartong (187) ist dies nun in neuerer Zeit dadurch gelungen, daß er den Gerbstoff im Trub mit Bisulfit reduzierte und sodann mit Hilfe von Aceton aus der Adsorptionsverbindung mit dem Eiweiß desorbierte. In der Azetonlösung ließ er sich dann einwandfrei nachweisen. Der Kunstgriff Hartongs erweist sich, wie unsere Erfahrungen mehrfach bestätigten, beim Arbeiten mit Gerbstoffen als allgemein sehr vorteilhaft für das präparative Arbeiten.

Nicht mehr unmittelbar mit dem in diesem Buch aufgeworfenen Thema hat die nähere Zusammensetzung der Aschenbestandteile des Trubes, die Entfernung von Schwermetallen wie Kupfer und Eisen durch den Trub und die Sedimentation des Trubes und ihre Beeinflussung durch verschiedene Faktoren zu tun. Diesbezüglich, sei auf die citierte Arbeit von Enders und Spiegl (185) sowie auf eine Veröffentlichung von Schild, Enders u. Spiegl (188) verwiesen.

Kühltrub.

Wird eine Würze, welche durch Filtration oder Zentrifugieren bei Temperaturen zwischen etwa 70 und 100° vom Heißtrub befreit wurde und ein vollkommen blankes Aussehen besitzt, weiter abgekühlt, so trübt sie sich in jedem Falle und nimmt bei Erreichung der Anstelltemperatur ein mehr oder weniger undurchsichtiges Aussehen an. Die Menge der sich bildenden Trübung ist verglichen mit der Heißtrubmenge sehr geringfügig. Lüers und Wiedemann (loc. cit. 186) gewannen aus 80 Liter 12%iger kochend heißfiltrierter Hopfenkesselwürze beim Abkühlen 4,5 g Kühltrübung (Trockensubstanz), was etwa 0,05% des Würzeextraktes ausmacht. Der Eiweißgehalt betrug 65,1%. Eine vorgenommene van Slyke-Hydrolyse ergab:

Ammoniak-N.	20,14%
Melanin-N.	1,15%
Cystin-N.	1,23%
Arginin-N.	6,79%
Histidin-N.	3,45%
Lysin-N.	4,90%
Amino-N. im Basenfiltrat	49,31%
Nicht-Amino-N. im Basenfiltrat	13,69%
	100,76%

Ein Vergleich mit der weiter oben gegebenen Analyse des Heißtrubes zeigt, daß die Kühltrübung eine gänzlich andere Zusammensetzung als der Heißtrub aufweist. Wenn man die Analysendaten mit jenen der bekannten Proteine der Gerste vergleicht, so ergibt sich die größte Ähnlichkeit mit dem Hordein. Nachdem aber das Hordein nicht wasserlöslich ist, kann es sich nicht um diesen Eiweißkörper handeln, es müßte denn sein, daß Abbauprodukte des Hordeins, die bereits wasserlöslich geworden sind, an der Kühltrübung Anteil nehmen. Da das Hordein im Laufe der Keimung zu salzlöslichen Eiweißstoffen abgebaut und umgewandelt wird, und nach neueren Feststellungen von Hartong gerade diese edestinähnlichen Stickstoffverbindungen zusammen mit Gerbstoffen die Eigenschaften, Kältetrübung zu verursachen besitzen, besteht heute kaum mehr ein Zweifel daran, daß die Globuline bzw. Globulosen des Malzes die Kühltrübung bilden. Ebenso steht jedenfalls fest, daß Heißtrub und Kühltrub zwei gänzlich verschiedene Verbindungen sind, dafür spricht einerseits die Verschiedenheit der durch die van Slyke-Analyse erhaltenen Ergebnisse, andererseits die Tatsache, daß sich die Kühltrübung gänzlich unabhängig und in völlig anderen Temperaturbereichen als der Heißtrub abscheidet.

Trotz der geringen Mengen, in welchen die Kühltrübung auftritt, hat man ihr seit langem besondere Beachtung geschenkt, weil die Art ihrer Abscheidung, nämlich amorph oder geflockt für Gärung und Geschmack des Bieres von Bedeutung sein kann. A. Reichard (189), der sich schon 1881 mit diesen Ausscheidungen befaßte, hat gefunden, daß beim langsamen Abkühlen der ruhig liegenden Würze die Ausscheidung der Kühltrübung in sehr feiner Form erfolgt, während bei rascher Abkühlung unter heftiger Bewegung ihre Abscheidung in Form hydratisierter Flocken stattfindet. H. T. Brown (190) hat dann 1913 die Ausscheidung dieser von ihm als „amorphe Substanz“ bezeichneten Trübung in sehr gewissenhaften,

berühmt gewordenen Untersuchungen studiert. Er stellte fest, daß der Dispersitätsgrad dieser Trübung oftmals ein so feiner ist, daß sie sich selbst während der Gärung nicht abscheidet, zu Trübungen Veranlassung gibt und die Kulturhefe vergiftet, indem sie an den Zelloberflächen absorbiert wird. Wilde Hefen sind gegen die amorphe Substanz verhältnismäßig immun. Die Teilchengröße dieses unangenehmen Körpers kann bei langsamem Abkühlen und ruhigem Stehen der Würze zwischen 1 Tausendstel Millimeter und der Grenze der Sichtbarkeit schwanken. Sobald aber die Würze von den Temperaturen, bei welchen sie an diesem Körper gesättigt ist, was etwa bei 55—60° der Fall ist, bewegt wird, lagern sich die kolloid dispersen Teilchen zu größeren Komplexen aneinander. Diese Bewegung kann z. B. durch Durchleiten eines kräftigen Gasstromes durch die Würze oder durch mechanische Erschütterungen in der Art des von alten Praktikern schon gekannten Aufdrückens der Würze erreicht werden. Es kommt bei diesem Ausscheidungsprozeß darauf an, daß man die Keimbildungsgeschwindigkeit und die Wachstumsgeschwindigkeit der amorphen Teilchen in ein günstiges Verhältnis zueinander bringt. Kühlt man langsam in Ruhe ab, so ist die Keimbildungsgeschwindigkeit eine große, aber die Teilchen bleiben klein und kolloid dispergiert. Sorgt man für Bewegung zur Zeit der Keimbildung, so wachsen die Teilchen zu großen Komplexen heran und koagulieren miteinander zu makroskopisch sichtbaren Flöckchen. Eine Nachprüfung der Brown'schen Befunde erfolgte in neuester Zeit durch Shimwell, Kirkpatrick und Baylis (1911). Es wurde festgestellt, daß die Zusammensetzung der Würze in einer noch nicht überblickbaren Weise einen Einfluß auf die Ausscheidung der Kühltrübung ausübt. Es gibt zwei Typen von Würzen, solche, die bei langsamer und solche, die bei schneller Abkühlung die beste Bruchbildung zeigen. Beim langsam kühlenden Typ ist die Bewegung hinderlich, beim schnell kühlenden Typ dagegen sehr förderlich, manchmal überhaupt zur Flockung der Kühltrübung unbedingt nötig. Beim langsam kühlenden Typ erwies sich ein höherer Gipsgehalt der Würze als bruchbegünstigend. Die kritische Kühlgeschwindigkeit, d. h. die Zeit, die beim Abkühlen der Würze von 60 auf 20° erforderlich ist, um zu einer flockigen Ausscheidung der Kühltrübung zu führen, kann bei den einzelnen Würzen zwischen weniger als 3 Sekunden bis zu 40 Sekunden betragen.

H. T. Brown sprach bereits die Vermutung aus, daß es sich bei der Kühltrübung um eine Verbindung von einem Eiweißkörper mit Gerbstoff handelt. In der Folgezeit hatte man diese Vorstellung, ohne daß sie eigentlich bewiesen war, in der Literatur dauernd über-

nommen. Erst Hartong (192 und loc. cit. 187) und Enders (193) haben in neuerer Zeit die Beweise für die Richtigkeit der Brown'schen Ansicht endgültig und überzeugend erbracht. Das Charakteristische der Kühltrübung der Würze und auch der Kältetrübung des Bieres ist ihre Reversibilität, das heißt, sie verschwindet wieder, wenn das System auf höhere Temperaturen gebracht wird. Kein reiner Eiweißkörper zeigt diese Eigenschaft, wohl aber die verschiedensten Eiweißkörper und einige höhere Abbauprodukte, wie die aus dem Edestin entstehenden Globulosen, wenn sie in Verbindung mit Gerbstoffen treten. Die Kühltrubmenge ist von verschiedenen Faktoren in hohem Maße abhängig.

Enders untersuchte mit Hilfe einer quantitativen, nephelometrischen Methode in einer ausführlichen Arbeit die verschiedensten Faktoren, welche auf die Menge der Kühltrübungsstoffe Einfluß besitzen.

Höherer Stickstoffgehalt des Malzes bedingt eine Erhöhung der Kühltrübungsmenge, was in Übereinstimmung mit ähnlichen Befunden von Jakob (loc. cit. 183) steht. Von großem Einfluß ist die Lösung des Malzes, wofür folgende Tabelle spricht:

Stadium	Kühltrübungs-	
	Punkt	Menge
2. Keimtag	50 ⁰	49,5
3. „	40 ^{0?}	25,0
5. „	50 ⁰	24,0
7. „	45 ⁰	24,5
24 Std. obere Horde	44 ⁰	20,5
vor Beginn d. Ausdarrens	43 ⁰	17,0
fertiges dunkles Malz	34 ⁰	8,5
Brühmalz	25 ⁰	2,5

Daraus geht hervor, daß mit fortschreitender Lösung des Malzes die Kühltrubmenge sehr erheblich abnimmt und daß auch das Darren sie noch einmal herabsetzt. Ein sehr stark gelöstes Brühhaufenmalz zeichnete sich durch eine sehr geringe Kühltrubmenge aus.

Feineres Schrot liefert etwas mehr Kühltrub als gröberes Schrot. Infusionsverfahren geben kühltrubreichere Würzen als Kochmaischverfahren, je mehr Maischen gekocht werden, desto geringer wird die Kühltrubmenge. Die Kühltrubmenge sinkt mit fallender Würzekonzentration, gleichzeitig verschiebt sich der Kühltrübungspunkt zu niedrigeren Temperaturen. Mit fallender Konzentration der Nachwürzen sinkt die Kühltrubmenge, jedoch zeigen die Nachwürzen, wie Jakob feststellte, nach dem Kochen mit Hopfen nahezu

den gleich hohen Kühltrübungspunkt, wie mit Hopfen gekochte Vorderwürze. Kochen der Würzen ohne Hopfen verringert die Kühltrubmenge umsomehr je länger gekocht wird. Das Kochen mit Hopfen erhöht sehr stark die Kühltrubmenge und zwar um so mehr, je mehr Hopfen gegeben wird. Dabei erweist sich das nach Extraktion der Bitterstoffe zurückbleibende Hopfenstroh als die Hauptquelle der Trübungsverursachung, woraus geschlossen werden kann, daß der Hopfengerbstoff für die Vermehrung der Kühltrübung verantwortlich zu machen ist.

Malzspelzen geben bei einem Infusionsmaischverfahren, bei welchem nicht gekocht wird, keine kühltrübenden Stoffe an die Würze ab. Erst durch das Kochen der heißfiltrierten Würze mit Spelzen werden aus den letzteren Kühltrübungsstoffe herausgeholt.

Die gebildete Kühltrübungssubstanz wird aber andererseits durch längeres Kochen der Würze wieder vermindert, sodaß nicht allein der kühltrubvermehrnde Einfluß des Mitkochens der Spelzen für die Kühltrubmenge der fertigen Würze verantwortlich ist.

Auch hier muß man im Spelzengerbstoff den Anlaß für die Bildung der Kühltrübungsstoffe erblicken. Der Gerbstoff hat aber nicht nur in der Spelze, sondern auch in der darunter liegenden Samenhaut seinen Sitz. Daraus erklärt sich die Tatsache, daß auch ein von seinen Spelzen befreites Malz beim Maischen, wenn auch in verringertem Maße, kältetrübe Würze liefert. Nacktgerste gibt Würzen von wesentlich geringerer Kühltrübung als bespelzte Gersten. Auffallend hohe Kühltrübungen liefern trotz Fehlens der Spelzen die Weizenmalze. Es scheinen also individuelle Verschiedenheiten bei den einzelnen Getreidearten vorzuliegen. Dasselbe ist der Fall bei den Gerstenmalzen. Eine Untersuchung von 10 Malzen, die nach einem Infusionsverfahren gemaischt worden waren, lieferte in den Würzen Kühltrübungsmengen von 18,1 bis 35,0, die nicht mit Unterschieden der Lösung erklärt werden können, sondern auf individuelle Verschiedenheiten der Gersten, bedingt durch Sorte, Provenienz, Klima usw. zurückzuführen sind. Diese individuellen Verschiedenheiten können größer sein, als die Faktoren, welche bei verschiedener Verarbeitung die Kühltrubmenge beeinflussen. Da möglicherweise die trübungsbildenden Eigenschaften vererbbar sind, lohnt es sich, bei der Gerstenzüchtung darauf das Augenmerk zu richten.

Nachdem alle Versuche immer wieder darauf hindeuteten, daß die Kühltrübung durch das Zusammenwirken von Eiweißstoffen und Gerbstoffen aus Malz und Hopfen zustande kommen, konnte En-

ders den endgültigen Beweis für die Richtigkeit dieser Vorstellung dadurch erbringen, daß er an Modellversuchen mit verschiedenen malzeigenen und malzfremden Eiweißstoffen und Tannin oder Hopfengerbstoff die an der Kühltrübung der Würze und an der Kältetrübung des Bieres beobachtete Reversibilität mit fallender und steigender Temperatur vollauf reproduzierte. Für die Menge der gebildeten Trübung ist die Konzentration der Komponenten von wesentlichem Einfluß, während die Konzentration der Würze als solche sich ohne Einfluß erweist.

Während Gelatine-Gerbstofflösungen eine auffallende, charakteristische Abhängigkeit ihrer Löslichkeit vom pH aufweisen (Optimum der Instabilität im isoelektrischen Punkt), und das System Leucosin-Hopfengerbstoff noch eine schwache pH-Abhängigkeit der Löslichkeit (maximale Instabilität bei pH 4,6) besitzt, zeigt das Edestin kaum mehr eine solche. Das stimmt mit der von Fink und Riedel (193) gefundenen Tatsache überein, daß das System Würze-Hopfengerbstoff eine auffallende Unabhängigkeit der Niederschlagsmenge vom pH aufweist.

Die Trübungsintensität der Eiweißgerbstoffverbindungen wird durch Luftsauerstoff durchwegs erhöht und die Ausflockung vermehrt und zwar gilt das sowohl für Systeme, an welchen Tannin als auch für solche, an welchen Hopfengerbstoff beteiligt ist. Diese Erscheinung erklärt sich damit, daß der Luftsauerstoff den Gerbstoff in Phlobaphen überführt, wodurch die reversibel lösliche Kältetrübung in die unlösliche Oxydationstrübung übergeht. (siehe hierzu besonders E. Helm 194).

Von praktischem Interesse sind noch die Befunde, welche Enders (195) über die Kühltrubmengen an 22 Betriebswürzen feststellte. Sie schwankten in dem außerordentlich weiten Bereich von 15,0 bis 35,0. Wenn es auch noch nicht möglich ist, aus diesen erheblichen Schwankungen technologische Schlüsse zu ziehen, so regen die Befunde doch dazu an, daß man sich mit dem auch heute noch nicht klar zu überblickenden und eindeutigen Problem des Kühltrubes eingehender in Zukunft befassen möge.

Im Laufe der bisherigen Ausführungen wurde wiederholt darauf hingewiesen, daß die Kühltrübung im Wesentlichen aus einer Protein-Gerbstoffverbindung besteht und daß diese Ansicht einerseits durch die analytischen Befunde Hartongs und die Modellversuche von Enders gesichert sei. Aus den Versuchs-Ergebnissen der beiden Autoren geht weiterhin hervor, daß zwischen der Kühltrübung der Würze und der Kältetrübung des Bieres in ihren

Eigenschaften so große Ähnlichkeit besteht, daß am genetischen Zusammenhang beider nicht zu zweifeln ist. In neuester Zeit ist es dem mehrfach erwähnten schwedischen Forscherkreis gelungen, größere Mengen von Kälte-trübung aus Bier zu isolieren und sie mit chemischen und physikalisch-chemischen Methoden zu analysieren. Die Befunde, über welche Sandegren (4) berichtet, haben, um es vorweg zu nehmen, das Ergebnis gezeitigt, daß die Kälte-trübung eine Verbindung von Gerbstoff mit Globulinkomponenten darstellt, ein weiterer endgültiger Beweis für die von Hartong und Enders bereits auf anderen Wegen gezogene Schlußfolgerung. Bei der nunmehr bewiesenen Übereinstimmung des chemischen Aufbaues von Kühltrübung der Würze und Kälte-trübung des Bieres erscheint es zweckmäßig die letztere nach der analytischen Seite hin in diesem Abschnitt zu behandeln.

Die Versuche der schwedischen Forscher bestanden zunächst darin, die Kälte-trübung des Bieres in Substanz zu isolieren. Zu diesem Zwecke wurden 100 hl 8%iges Bier vom Pilsner Typ der München Bryggery in Stockholm bei einer Temperatur von $+2^{\circ}\text{C}$ und einem Durchsatz von 14 hl in der Stunde zentrifugiert. Das so geklärte Bier wurde dann 8 Tage lang bei 0°C gelagert und unter Aufrechterhaltung dieser Temperatur erneut zentrifugiert, wobei die Separierungsgeschwindigkeit nun auf 10 hl/h herabgesetzt wurde. Aus dem Separator wurden einige 50 g Kälte-trübung gewonnen, mit einem Trockensubstanzgehalt von 23,4%, entsprechend 116 mg Kälte-trübungstrockensubstanz im Hektoliter. Später konnte die Methode so verbessert werden, daß bis zu 250 mg je Hektoliter an Ausbeute erhalten wurden. Das von der Kälte-trübung befreite Bier war bedeutend unempfindlicher gegen Kälte, durch Zusatz kleiner Mengen der isolierten Trübungssubstanz wurde es wieder empfindlicher.

Der Stickstoffgehalt der Trübungstrockensubstanz betrug 9,6—10% oder ca. 60—62% Protein. Nach dem Vorgang von Hartong (192) ließ sich mit Hilfe von Azeton der Gerbstoff vom Protein abtrennen und als solcher nachweisen, jedoch war eine quantitative Trennung beider Komponenten nicht zu erreichen. Lösungen der Kälte-trübung in Azeton-Wasser oder Äthylenglycol-Wassermischungen wurden in der Ultrazentrifuge untersucht. Die gefundene Sedimentationskonstante von 4 entspricht einem Molekulargewicht von etwa 40 000. Um festzustellen, in welchem Verhältnis Tannin und Protein in der Kälte-trübung enthalten sind, stellte Danielsson mit definierten Proteinen mit einem Mol.-Gewicht von

30 000 einige Versuche an. Sie wurden bei pH 5 mit Tannin gefällt, die Fällungen abzentrifugiert und in Pufferlösungen von pH 9 gelöst. Bei Versuchen in der Zentrifuge wurden Sedimentationskonstanten erhalten, welche um etwa 30% höher als die der entsprechenden Proteine waren. Der Stickstoffgehalt von 1 g der Tannin-Proteinverbindung wurde zu 60—65% desjenigen eines Grammes der entsprechenden Proteine gefunden. Daraus ergibt sich ein Tanningehalt von 35—40%. Daraus wiederum kann man schließen, daß die Proteinkomponente der Kältetrübung eine Sedimentationskonstante von ungefähr 3, entsprechend einem Mol.-Gewicht von $\sim 30\,000$ besitzt.

Die Frage, ob hauptsächlich das Spelzen- oder Hopfentannin an der Kältetrübung beteiligt ist, läßt sich noch nicht mit Sicherheit beantworten. Es werden wohl alle beide daran teilnehmen. Daß der Spelzengerbstoff aber mitbeteiligt ist, läßt sich daraus schließen, daß ein ohne Hopfen bereitetes Bier ebenfalls kälteempfindlich ist. Da andererseits leicht nachgewiesen werden kann, daß eine Würze durch das Hopfenkochen ein Bier mit gesteigerter Kälteempfindlichkeit liefert, ist die Folgerung berechtigt, daß sowohl Spelzen- als Hopfengerbstoff im Verein mit Globulosen die Kältetrübung bedingen.

Außer Tannin und Protein wurden in der Kältetrübung noch 3,4% Kohlehydrat, als Dextrose auf Trübungstrockensubstanz gefunden. Unter der Annahme, daß der 35—40% betragende Tanningehalt der Kältetrübung von einer Pentadigalloyl-dextrose her stammt, würde sich daraus ein Dextrosegehalt der Kältetrübung von 3,5 bis 4% berechnen, was jedoch vorerst speculativ ist, da die Natur des Tannins nicht genau bekannt ist. Jedenfalls enthält die Kältetrübung keine oder nur sehr geringe Mengen höher molekularer Dextrine.

Es blieb nun noch der Nachweis zu führen übrig, ob die Kältetrübung sich von einer der Globulinkomponenten herleite. Zu diesem Zwecke behandelte Säverborn normal kälteempfindliches Bier mit Bentonit (Tonerdesilikat), welches die Kältetrübung nachgewiesenermaßen restlos adsorbierte.

Solches mit Bentonit behandelte Bier wurde mit einer Lösung von β -Globulin aus Gerste versetzt, welche durch Kochen des Globulins in etwas mit Bentonit behandeltem Bier erhalten war. Nach einstündigem Rühren, Klarfiltrieren und mehrstündigem Kühlen trat die Kältetrübung in typischer Weise auf, verschwand beim Erwärmen, um beim Abkühlen wieder zu erscheinen.

Wurde der Versuch mit den $\alpha + \gamma$ -Globulinen anstatt des β -Globulins durchgeführt, so trat zwar auch eine Kältetrübung auf, jedoch zeigte diese infolge Nichtreversibilität einen anderen Typ. Die Kältetrübung auf Basis β -Komponente war äußerst fein dispers und sedimentierte nicht, während $\alpha + \gamma$ -Kältetrübung flockig war und rasch sedimentierte. Aus allem kann somit als wahrscheinlich vermutet werden, daß die Abbauprodukte des β -Globulins die Ursache der Kältetrübung darstellen.

Ein weiterer Faktor unterstützt diese Annahme. Die in der Kältetrübung enthaltenen Proteine haben den hohen Schwefelgehalt von 1,9—2,0%, während nach Osborne Gerstenalbumin 1,41 und Hordein nur 0,83% Schwefel enthalten. Über das Gerstenglobulin macht Osborne zwar keine Angaben, jedoch gibt er den Schwefelgehalt von Weizen- und Maisglobulin mit 0,69 und 0,86% an. Die Bestimmung des Schwefelgehaltes der Globulinkomponenten ergab nun für die β -Komponente 1,94%, während $\alpha + \gamma$ -Komponente nur 1,6% enthielten. Auch damit ist eine Stütze für die Beteiligung der β -Globulinkomponente an der Kältetrübung zu erblicken.

Der hohe Schwefelgehalt deutet auf die Möglichkeit des Vorkommens von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Cystein mit oxydierbaren Sulfhydrylgruppen hin.

Außerdem wurde in der Kältetrübung noch 0,3% Asche gefunden, die 46% Cupri- und 17% Ferrioxyd enthielt, während der Rest aus Phosphorpentoxyd bestand. Möglicherweise spielen diese Metalle eine katalytische Rolle bei der Oxydation der Kältetrübung, welche mit Hilfe der Sauerstoffadsorption in der Warburgapparatur verfolgt wurde. Die Sauerstoffadsorption ist zunächst sehr gering, sie steigt aber ganz außerordentlich an, wenn die Trübung mit U. V.-Licht einer Quecksilberlampe bestrahlt wird. Ohne die Bestrahlung setzt der Anstieg der Sauerstoffadsorption erst später ein, so daß die Bestrahlung einen katalysierenden Effekt ausübt. Die Verhältnisse gleichen dem Verhalten von Bier bei Feststellung seiner Oxydationsstabilität, die man durch Schütteln von pasteurisiertem Bier und Messen seiner Trübung in bestimmten Zeitintervallen ausführt. Auch bei solchen Versuchen zeigt sich eine Inkubationsperiode, während welcher die Trübung nicht zunimmt, um dann nach Verlauf von z. B. 17 Tagen rapid anzuwachsen. Aus der Praxis ist bekannt, daß der Einfluß der Belichtung die Zeit des Auftretens der Oxydationstrübung abkürzt. Wie Helm (1936) zeigte, verringert Luftsauerstoff die Kältestabilität des Bieres, sodaß man annehmen darf, daß die Kältetrübung die Substanz darstellt, welche nach der Oxydation die Trübung im Bier bildet.

Die hier ausführlich referierten neuesten Ergebnisse des schwedischen Forscherkreises haben somit unsere Kenntnisse über die Kältetrübung in erfreulicher Weise vertieft und zugleich eine Bestätigung für die von anderen Forschern, vornehmlich Hartong, Helm, Enders, gefaßten Vorstellungen über die Kältetrübung gebracht, die von diesen zum Teil auf ganz anderen experimentellen Untersuchungen fundiert worden waren.

Es darf hier, um den verdienstvollen Arbeiten Hartongs (192) gerecht zu werden, noch auf Modellversuche eingegangen werden, die ihn zu den heute gültigen Vorstellungen über die Kältetrübung brachten.

Gerste wurde mit 5%iger Kaliumsulfatlösung extrahiert, das Filtrat mit Azetatpuffer auf pH 4,6 gebracht und durch Kochen das Albumin auskoagulierte. Das völlig klare Filtrat des Koagulums wurde mit 30 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung je 100 ccm Filtrat ausgesalzen und damit die Globulosefraktion von anderen N-Verbindungen isoliert. Die Aussalzung wurde nach Absaugen in 0,01 mol. Phosphatpuffer von pH 5,5 enthaltend 10% Glukose gelöst. Diese künstliche Würze zeigt keine Koagulation beim Kochen und keine Trübung beim Abkühlen, obwohl sie ein natürliches Gersten-Protein von hohem Molekulargewicht enthält und beim Schütteln dicken, festen Schaum gibt. Diese künstliche Würze wurde mit wässrigem Hopfenextrakt aus mit Aether vorextrahiertem Hopfen gekocht. Dieser Hopfenextrakt enthielt also nur die wasserlöslichen Gerbstoffe, jedoch keine Bitterstoffe. Beim Kochen blieb die Lösung klar, bei längerem Kochen trat geringfügige Koagulation ein, welche auf eine Oxydation der Protein-Tanninverbindung zurückgeführt wird. Nach Abfiltrieren zeigte die blanke Lösung beim Abkühlen die wohlbekannte Opaleszenz, die bis zum andern Tag ein milchig-trübes Aussehen angenommen hatte. Beim Erwärmen trat wieder klare Lösung ein. Die Schlußfolgerung Hartongs war: Eine albuminfreie Lösung der Gerstenglobulose liefert beim Hopfenkochen die Kühltrübung. Der lange Zeit schwierige Nachweis der zweiten Komponente, des Gerbstoffes gelang Hartong (192, 196) durch den Kunstgriff, die oxydierte Form des Gerbstoffs durch Natriumbisulfit zu reduzieren und diesen dann aus dem Koazervat mit dem Protein mit Hilfe wässrigen Acetons zu extrahieren. Die so erhaltene Gerbstofflösung gab einwandfrei mit Ferrichlorid die für Hopfengerbstoff charakteristische Grünfärbung.

Hartong (196) hat auf Grund kolloidchemischer von Bungenberg de Jong (197) entwickelter Vorstellungen auch folgende Theorie über das Zustandekommen der Kältetrübung entwickelt:

Der Gerbstoff wird an die kolloiden Eiweißmizellen adsorbiert, wodurch die Eiweißmizellen dehydratisiert, entwässert werden, was sich durch Viscositätsmessungen feststellen läßt. Beim Abkühlen schreitet die Dehydratation weiter, weil der Gerbstoff das Wasser abstößt. Schließlich werden die Mizellen zu derart konzentrierten Gebilden, daß sich das System in zwei Phasen entmischt. (Kühltrübungspunkt). Die Kältetrübung scheidet sich in Form flüssiger Tröpfchen aus, die sich aneinander lagern, indem sie Koazervate bilden. Die mikroskopischen Befunde an der Glutentrübung sprechen für die geschilderte Art ihres Entstehens. Hartong hat durch zahlreiche Versuche experimenteller Art die Richtigkeit seiner Theorie zu stützen versucht und insbesondere auch die Reversibilität der Kühltrübung als eine Folge der Rehydratation und der Desorption des Gerbstoffes bewiesen, worauf hier im einzelnen nicht eingegangen werden kann. Zum Thema Kältetrübung sei noch auf eine eben erschienene Veröffentlichung von W. Piratzki in „Die Brauerei“ 2. 33. 1948 (Berlin) verwiesen.

Nach dieser allgemein und vorwegnehmenden Behandlung der Kältetrübung des Bieres und der Kühltrübung der Würze müssen wir nun nochmals auf die letztere kurz zurückkommen.

Mit der Ausscheidung der Kühltrübung aus der Würze geht auch, wie Kolbach und Wilharm (165) zeigten, eine Verminderung des koagulierbaren Stickstoffs der Würze einher. Zwischen heißfiltrierter Ausschlagwürze und Anstellwürze ergaben sich folgende Unterschiede im koagulierbaren N.:

Ausschlag-	Anstell-Würze	Abnahme beim Kühlen
2,52	1,70	0,82
2,95	1,82	1,13
2,66	1,68	0,98

Die Abscheidung von rund 1 mg koagulierbaren Stickstoffs während des Kühlens ist größer als eine Verlängerung der Kochdauer der Würze von z. B. 60 auf 112 Minuten mit sich brachte (0,56 mg).

Der Einfluß der Bewegung während des Abkühlens konnte dadurch aufgezeigt werden, daß Ausschlagwürze einmal ruhig über Nacht auf 4,5° abgekühlt und das anderemal normal über den Kühlapparat abgekühlt wurde.

	Versuch 2	Versuch 3
a) Ausschlagwürze	2,95	2,66
	0,64	0,54
b) ruhig gekühlt	2,31	2,12
	0,49	0,44
c) Anstellwürze	1,82	1,68

Den Unterschied zwischen b und c darf man auf die butternde Wirkung zurückführen, welche beim Fließen über den Kühler erfolgt. Wahrscheinlich werden durch die butternde Bewegung schwerer abscheidbare und gefährlichere Stoffe (amorphe Substanz) zur Abscheidung gebracht. Damit wäre nach Kolbach und Wilharm auch die Möglichkeit gegeben, die Wirkung von Kühlschiff und Kühlschiffersatzapparaten auf die Kühltrubabscheidung durch analytische Bestimmung des koagulierbaren Stickstoffs zu verfolgen und zu beurteilen.

Bei der Bedeutung des Kühltrubes als Muttersubstanz für Kälte- und Oxydationstrübung des Bieres ist die möglichst restlose Abscheidung desselben aus der Würze empfehlenswert. Auf die technologischen Maßnahmen, die diesem Ziele dienen, sei im Rahmen dieser Ausführungen nur mit ein paar Stichworten hingewiesen: Aufkrücken der Würze am Kühlschiff bei Temperaturen von ca. 60° abwärts; Wellenbewegung durch Sterilbelüftung der Kühlschiffwürze; Adsorption des Kühltrubes durch Heißtrub im Nathanischen Trubabsatzgefäß oder nach dem Greinerschen Verfahren; Zentrifugieren der Würze; Tiefkühlung der Würze und Filtration; Behandlung mit Adsorptionsmitteln.

e) Zusammensetzung der Würze.

Von stickstoffhaltigen Verbindungen kommen in der Würze in sehr geringer Menge genuine, koagulierbare Eiweißstoffe vor. Die überwiegende Menge der Stickstoffsubstanzen werden von Eiweißabbauprodukten gebildet, welche ihrem Typ nach höhere und niedere Polypeptide (früher Albumosen und Peptone genannt) darstellen. Auch freie Aminosäuren und Amide, ferner Betain und Cholin kommen in geringer Menge in der Würze vor. Ein geringer Teil der Stickstoffkörper tritt als Eiweißgerbstoffverbindungen auf. Zu den stickstoffhaltigen Substanzen sind ferner noch die beim Darren des Malzes und Kochen der Würze entstehenden Röststoffe, vor allem die Melanoidine, dann Histobasen und β -Alanin, sowie die Vitamine B₁ und B₂, Nicotinsäureamid und Pantothersäure zu zählen.

In quantitativer Beziehung macht der Stickstoff als Eiweiß berechnet ($N \times 6,25$) zwischen 3,10 und 5,6% des Würzeextraktes aus. Vom Gesamt-Würzestickstoff sind etwa

- 55%* an Kohle adsorbierbar
- 20—25% durch Tannin fällbar
- 20—25% durch Magnesiumsulfat fällbar
- 33% durch Uranylazetat fällbar
- 30% formoltitrierbar
- 45—50% durch Hefe assimilierbar.

etwa 9 bis 11% des formoltitrierbaren Stickstoffs liegen als Ammoniakstickstoff vor.

100 ccm 12%ige Anstellwürze enthalten noch etwa 1—2 mg koagulierbaren Stickstoff.

D. Die Gärung

a) Allgemeines über die Bedeutung des Stickstoffs für den Stoffwechsel der Hefe.

Wie für die höheren pflanzlichen und tierischen Organismen, so ist auch für die Hefezelle eine Versorgung mit Stickstoff unerlässlich. Während die Kohlehydrate in der Hauptsache im Betriebsstoffwechsel zur Erzeugung der Energie für die Funktionen und Leistungen der Hefe verbraucht werden, dienen die Stickstoffverbindungen in erster Linie im Baustoffwechsel zur Aufrechterhaltung der dauernd zu Verlust gehenden Zellsubstanz und für den Aufbau neuer Leibessubstanz bei der Vermehrung der Hefe. Beide Stoffwechseltypen sind miteinander enge verknüpft und müssen es auch sein, wenn die Hefe funktionstüchtig bleiben soll. Max Rubner (198) hat in seinen schönen, viel zu wenig beachteten Studien über den Stoffwechsel der Hefe die Verhältnisse mit folgenden zutreffenden Worten charakterisiert: „Ohne Nahrung schnell der Autolyse unterliegend, kann sie (die Hefe) ihre freie Existenz in N-freien, aber gärfähigen Medien nur über eine enge Spanne Zeit hin ausdehnen, sie geht dann zugrunde, Leben ohne Stickstoff ist nur eine Episode im sonstigen Kreislauf ihrer Existenz“.

Der Stickstoff in der Hefe unterliegt einer Abnützung, die um so größer ist, je stürmischer der Stoffwechsel verläuft. Kann die Hefe den zu Verlust gehenden Stickstoff nicht mehr ersetzen, dann stellt sie zunächst ihre Vermehrungsfähigkeit ein und behält noch mehr oder minder lange Zeit ihr Gärvermögen, verliert dabei aber weiter Stickstoff, wobei die Gärleistungen von Tag zu Tag geringer, die Hefe immer träger wird. Rubner, der als Maß der Energieleistung die produzierten Kalorien betrachtete fand bei einer derartigen, sich an Stickstoff allmählich erschöpfenden Hefe beispielsweise folgende Verhältnisse:

1 g Stickstoff in der Hefe erzeugt in 24^h cal.

1.	2.	3.	4.	5.	6. Tag
23,7	18,2	13,2	9,3	7,9	7,4

Der Stickstoff der Hefe unterliegt somit einer „Abnützungsquote“, die umso größer ist, je intensiver der Stoffwechsel verläuft. In neuerer Zeit konnte V. Hartelius (199) die Ergebnisse Rubners bestätigen, indem er fand, daß in Perioden intensivsten Wachstums die N-Aufnahme und Abscheidung durch die Hefe am größten ist.

Diese nur kurz orientierende Einführung sollte von allgemeinen Gesichtspunkten die Bedeutung des Stickstoffs im Hefeleben skizzieren. Das Gebiet ist derartig vielseitig und umfangreich, daß sich damit ein eigenes Buch füllen lassen würde. Hier bleibt im Sinne unserer Studie deshalb nur eine Beschränkung auf den Wandel, den die Proteine und Stickstoffverbindungen im Verlauf der Gärung erfahren, sofern man nicht ins Unermeßliche und Uferlose geraten wollte.

1. Die Stickstoffquellen und ihre Assimilierbarkeit. •

Eine Aufnahme des atmosphärischen molekularen Stickstoffs durch die Hefe kommt praktisch nicht in Frage, obgleich früher schon Fulmer und Christensen (200) und neuerlich Schanderl (201) auf eine solche Möglichkeit hinweisen. Dagegen ist der Ammoniakstickstoff für die Hefen eine sehr gut verwertbare Stickstoffquelle, wie seit langem bekannt und erneut von Pirschle (202) in umfangreichen Versuchen festgestellt wurde. Von den Ammoniumsalzen wirken jene der organischen Säuren (Essigsäure, Milchsäure), ferner das Karbonat und Bikarbonat besonders günstig, weil beim Verzehr des Ammoniaks eine schwache Säure oder aber die gasförmig entweichende Kohlensäure in Freiheit gesetzt wird, während beim Ammonchlorid und Sulfat freie Salz- und Schwefelsäure entstehen, die zu einer das Hefewachstum limitierenden Azidität (pH unter 3—4) Veranlassung geben. Auch das 2 basische Ammonphosphat erweist sich mit Rücksicht auf die starke Pufferung der Phosphorsäure günstig. Nitrate erweisen sich als wenig vorteilhafte N-Quelle, weil sie durch lebende Hefe zum schädlichen Nitrit reduziert werden. Die intermediäre Entstehung von Nitrit führt nach W. u. F. Windisch (203) zur Degenerierung der Hefe und zu unangenehmen geschmacklichen Veränderungen des Bieres, sodaß Brauwässern mit

höherem Nitratgehalt Beachtung zu schenken ist. Der Wert des Ammonnitrates als Stickstoffquelle steht etwa zwischen dem der Ammonsalze und der Nitrats.

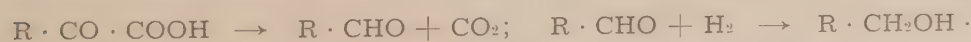
Die bisher aufgeführten N-Verbindungen beanspruchen mehr oder minder nur theoretisches Interesse, da sie in der Würze nicht oder wie Ammonsalze oder Nitrate nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Unter praktischen Verhältnissen kommt vielmehr den organischen Stickstoffverbindungen ausschlaggebende Bedeutung zu. Hier sind es vor allem die Aminosäuren, welche von der Hefe unter Herausnahme der Aminogruppe in Form von Ammoniak als Stickstoffquelle verwertet werden. Man kann auf Grund der Erfahrungen über die sehr gute Eignung der Verbindungen des Ammoniaks behaupten, daß eine organische Stickstoffverbindung um so besser sich für die Hefe als Stickstoffquelle eignet, je leichter ihr Stickstoff von der Hefe in Ammoniak übergeführt wird.

Der Weg, auf dem der Stickstoff der Aminosäuren von der Hefe verwertet wird, wurde nach älteren, im Prinzip wohl zutreffenden, aber im Chemismus noch nicht richtig erkannten Vorstellungen F. Ehrlichs von Neubauer und Frommherz (204) und in neuerer Zeit von anderen Forschern bestätigten und erweiterten Versuchen (siehe W. Franke (205) aufgezeigt.

Darnach geht die Aminosäure zunächst unter Dehydrierung in die Iminosäure über, welche ihrerseits unter Reaktion mit Wasser α -Ketocarbonsäure und Ammoniak liefert.



Die Ketosäure wird in bekannter Weise von der Carboxylase in Aldehyd und Kohlensäure gespalten. Der Aldehyd geht dann im Falle der alkoholischen Gärung unter Hydrierung in den entsprechenden Alkohol über:



Im Endeffekt entsteht also aus einer Aminosäure der um einen Kohlenstoff ärmere Alkohol und Ammoniak, welches letzteres von der Hefe zum Aufbau ihrer stickstoffhaltigen Protoplasmabestandteile verwertet wird.

Folgende Beispiele, zum größten Teil einer Veröffentlichung von Thorne (206) entnommen, mögen zur Illustration der vorhandenen Möglichkeiten dienen:

Aminosäure	entstehendes Produkt
Tyrosin	Tyrosol
Tryptophan	Tryptophol
Phenylalanin	Phenylaethylalkohol
Valin	Isobutylalkohol
Leucine	Amylalkohole
Alanin	Aethylalkohol

Isobutylalkohol und die Amylalkohole bilden den Hauptbestandteil der Fuselöle. Da sie, wie auch die Alkohole mit aromatischem Kern (Tyrosol, Tryptophol, Phenylaethylalkohol) durch ihren auch in starker Verdünnung feststellbaren Geruch und Geschmack ausgezeichnet sind, tragen sie zu einem wesentlichen Teil zum Aroma und Bouquet vergorener Getränke bei. Je nach der Menge und Art der hauptsächlich im Gärsubstrat vorliegenden Aminosäuren wird sich das Bouquet jeweils erheblich unterscheiden (Bier, Wein, Rum, Arrak), wobei allerdings auch noch andere geschmacksbildende organische Verbindungen, ferner die Hefenrasse eine Rolle spielen. Die Alkohole können während der Lagerung und Reife der vergorenen Getränke mit verschiedenen Säuren verestert werden, wobei die Ester geschmacklich und geruchlich nach stärker als die Alkohole sich auswirken.

Umfangreiche Versuche über die Assimilation der einzelnen Aminosäuren verdanken wir vor allem Nielsen und Hartelius vom Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen. Die umfangreiche Literatur bis zum Jahre 1938 findet sich in einem Sammelreferat von Jllies (207) verzeichnet und ist auch in neuester Zeit von Nielsen (208) selbst zusammenfassend dargestellt worden.

Von den dänischen Forschern wurden 45 reine Aminosäuren aller Typen untersucht und dabei besonders auf die Isomerieverhältnisse geachtet. Ein Vergleich der optisch aktiven mit den razemischen Aminosäuren ergab, daß mit ganz geringen Ausnahmen nur eine optische Antipode und zwar die natürlich vorkommende assimiliert wurde. Von einer gewissen Länge der Kohlenstoffkette an, war die Assimilierbarkeit aufgehoben, z. B. bei der Amino adipinsäure $\text{COOH} - \text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_3 \cdot \text{COOH}$, ebenso bei der Diamino adipinsäure, bei der Diaminopimelinsäure $\text{COOH} \cdot \text{CHNH}_2(\text{CH}_2)_3 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$ und beim Lysin $\text{CH}_2 \text{NH}_2 \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$.

Glutaminsäure mit 5 Kohlenstoffatomen war dagegen assimilierbar, sodaß die Autoren die Grenze der Assimilierbarkeit bei einer Kette zwischen 5 und 6 C-Atomen anzunehmen glaubten. Da jedoch in einer späteren Arbeit V. Hartelius (209) zeigen konnte, daß alle

α -Aminomonocarbonsäure von 2 bis 8 C-Atomen ausgezeichnet assimiliert werden, kann die allgemeine Theorie von der Grenze der Assimilierbarkeit zwischen 5 und 6 C-Atomen nicht aufrecht erhalten werden.

Möglicherweise spielt bei der Amino adipin- und Pimelinsäure ihr Charakter als Dicarbonsäure die entscheidende Rolle.

Werden die H-Atome durch Methylgruppen ersetzt, so leidet das Aufnahmevermögen, so ist das Sarkosin $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NHCH}_3$ und das Dimethylaminoglycocoll $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ völlig unassimilierbar. Substitution am β -C-Atom z. B. β -Alanin ruft stärkste Störung hervor. Wird im Alanin die Phenyl- oder Oxyphenylgruppe eingeführt, so bleibt die Assimilierbarkeit erhalten, eine Steigerung tritt noch ein, wenn die genannten Gruppen durch die OH-Gruppe ersetzt werden. Bei Histidin und Tryptophan sind nur 30 bzw. 50% des Gesamt-N. also nur der Stickstoff der Seitenkette assimilierbar. Der Stickstoff des l-Prolins ist auffallenderweise assimilierbar, während der des Oxyprolins nicht assimilierbar ist. Die 3 Aminobenzoessäuren werden nicht assimiliert, ebenso wenig das Threonin α -Amino — β -oxybuttersäure, während das homologe Serin (α — Amino β — oxypropionsäure) sehr gut aufgenommen wird. Cystein und Taurin werden nicht assimiliert, dagegen sehr gut das Methionin, das für die Hefe ein Wuchsstoff ist.

Von Asparagin- und Glutaminsäure ist der Stickstoff in beiden optischen Isomeren gleich gut verwertbar. Für die Glutaminsäureassimilation haben v. Euler, Adler und Steenhoff-Eriksen (210) nachgewiesen, daß der erste Schritt die Dehydrierung durch die Glutaminsäure-Apodehydrase + Codehydrase II ist. Die Glutaminsäure geht über die Iminosäure in α -Ketoglutarsäure und schließlich in Bernsteinsäure über, während der abgespaltene Ammoniak der Hefe als N-Nahrung dient.

Über die Assimilierbarkeit von Arginin und Histidin berichten Edlbacher und Segesser (211). Es zeigte sich, daß die Assimilierbarkeit dieser beiden Aminosäuren nur bei Abwesenheit von Ammoniumsalzen gegeben ist. Auch Hartelius fand ähnliche Verhältnisse bei seinen Assimilationsversuchen mit α -Aminosäuren, mehrere wurden in Gegenwart von Ammonsalzen schlechter assimiliert als bei deren Abwesenheit. Daraus geht hervor, daß die Hefe den leichter assimilierbaren Ammoniakstickstoff vorzieht. Arginin wird quantitativ durch die Arginase in Harnstoff und Ornithin gespalten, sofern der Sauerstoff abgehalten wird. Beide werden von der Hefe assimiliert. Histidin wird von lebender Hefe assimiliert, ohne

daß Umwandlungsprodukte (Histidol) zu fassen sind. Zum gleichen Resultat gelangte auch Keil (212).

Thorne (212a) stellte in neueren Untersuchungen fest, daß Hefe in einem Medium mit 2 Stickstoffverbindungen gewöhnlich einen Wachstumszuwachs im Vergleich mit einem Medium mit nur einer Stickstoffverbindung aufweist. Gleichzeitig aber findet eine erhöhte, bevorzugte Assimilation der geeigneteren N-Verbindung statt. Daraus folgerte Thorne, daß ternäre N-Gemische noch höhere Wachstumswerte als binäre, quaternäre höhere als ternäre liefern sollten. Praktisch ergaben binäre Gemische einen Zuwachs von 20% gegenüber einer N-Verbindung, ternäre einen Zuwachs von 8% gegenüber binären und quaternäre einen solchen von 5% gegenüber ternären. Eine Grenze wird etwa bei einer 50%igen Wachstumssteigerung erreicht, die bei beliebigem weiteren Zusatz von N-Komponenten nicht mehr überschritten werden kann. Bei Würze mit ihrer unbekannten, aber großen Zahl von N-Komponenten ist die Gelegenheit zur vollen Wachstumssteigerung der Hefe gegeben. Weiterhin beobachtet Thorne, daß ein Gemisch von Tyrosin und Glycocoll einen wachstumshemmenden Einfluß auf Hefe ausübt, und zwar ist dieser Einfluß nur für dieses Aminosäuregemisch spezifisch, da er weder von Tyrosin allein, noch von Phenylalanin + Glycocoll erreicht wurde. Die durch den Zusatz von Glycocoll zu Tyrosin hervorgerufene Wachstumshemmung bewegte sich in den Grenzen von 0 bis 40%.

Von Peptiden wurden von Nielsen und Hartelius insgesamt 15 auf ihre Assimilierbarkeit geprüft, darunter Di-, Tri- und Tetrapeptide und zwar mit dem Erfolg, daß die Hefe nicht nur Dipeptide sondern auch Polypeptide als Stickstoffquelle zu verwerten vermag, allerdings werden die Peptide langsamer assimiliert als die Aminosäuren, auch ist das Wachstum der Hefe deutlich langsamer. Ist in einem Peptid eine nicht assimilierbare Aminosäure oder die d-Form einer Aminosäure, deren l-Form assimilierbar ist, eingeführt worden, so wird die Assimilierbarkeit des Peptides verhindert oder soweit herabgesetzt, als dem assimilierbaren Teil entspricht.

Von sonstigen nicht zur Reihe der Aminosäuren gehörenden organischen Stickstoffverbindungen erwies sich in der Puringruppe nur die Harnsäure verwertbar. Guanin, Xanthin und Pyrimidin werden nicht assimiliert, vom Adenin wird ein fünftel, also wohl die Aminogruppe aufgenommen. Das Guanidin, das vorzüglich assimiliert wird, hat die auffallende Eigenschaft, äußerst kleine Hefenzellen hervorzurufen. Auch Allantoin und Harnstoff werden gut ausgenützt.

Aus den Versuchen Nielsens geht somit hervor, daß die Hefe den niedrig molekularen Stickstoff bevorzugt. Dies beweisen auch Versuche von Nielsen, in denen er durch Dialyse von Würze eine Fraktionierung des assimilierbaren Stickstoffs vornahm. Eine helle Würze mit 42% des Gesamt-N an assimilierbaren N wurde 4 Tage dialysiert. Von der Innenflüssigkeit waren noch 19%, von der Außenflüssigkeit 68% assimilierbar, sodaß also eine Aufspaltung in leicht und schwer assimilierbaren Stickstoff eingetreten war. Durch Wahl geeigneter Dialysiermembranen konnte das Verhältnis der beiden Stickstoffarten noch weiter verschoben und damit der Beweis erbracht werden, daß die Hefe nur den niedermolekularen Stickstoff assimiliert. Hat die Hefe die Wahl zwischen Ammoniakstickstoff und Aminosäurestickstoff, so zieht sie den ersteren vor. Manche Aminosäuren, die als alleinige N-Quelle sehr gut assimiliert werden, bleiben in Gegenwart von Ammoniakstickstoff unberührt z. B. Aminocaprylsäure, Glycocoll, Harnstoff und auffallender Weise Glutaminsäure. Eine Ausnahme machen dagegen Asparagin und Asparaginsäure, die dem Ammoniak-N vorgezogen werden.

Der niedrigmolekulare organische Stickstoff der Würze ist formoltitrierbar, er macht etwa 25—30% des Gesamtwürzestickstoffs aus. Im Einzelfall sind davon 70%, im Durchschnitt 50% durch Hefe assimilierbar, ein weiterer Beweis dafür, daß die Hefe in erster Linie den niedermolekularen Stickstoff vorzieht. Daß nicht der gesamte Formol-N assimilierbar ist, ist nicht verwunderlich, denn auch die höheren Peptide, sowie Albumosen und Peptone enthalten formoltitrierbaren Stickstoff, der jedoch nicht oder nur langsam assimiliert wird. Ebensowenig ist der Stickstoff der hochmolekularen Eiweißkörper für die Hefe verwertbar.

2. Wuchsstoffe.

Bezüglich der für die Hefe erforderlichen Wuchsstoffe, von denen ein erheblicher Teil Stickstoff enthält, sei auf eine zusammenfassende Darstellung von A. Janke (213) verwiesen. Es soll hier nur ganz kurz das Wichtigste angedeutet werden.

Die verschiedenen Heferassen verhalten sich im Bedarf an Wuchsstoffen grundverschieden. Es gibt darunter solche wie die wilde Hefe *Torulopsis utilis*, die hinsichtlich der Wuchsstoffe völlig autotroph sind, also ohne Wuchsstoffe in der Nährlösung gedeihen, weil sie in der Lage sind, die Wuchsstoffe aus Kohlehydraten und anorganischen Stickstoffquellen aufzubauen und wiederum andere wie die Kulturhefen, welche gegenüber Wuchsstoffen heterotroph sind, sie also als solche oder mindestens in Form von komplizierter

gebauten organischen Vorstufen in der Nährlösung vorfinden müssen, da sie selbst zur Totalsynthese derselben nicht befähigt sind. Kurz zusammengefaßt kommen als Hefenwuchsstoffe folgende in Betracht:

Mesoinosit (Bios I), Biotin (Bios II oder II B), Aneurin (Vitamin B₁), Glutaminsäure, β -Alanin und Pantothersäure, gegebenenfalls auch Heteroauxin (β -Indolylessigsäure). Dazu kommt noch nach Fulmer, Underkofler und Lesh (214) Magnesiumsulfat, das zusammen mit Bios II oder Bios I + II, das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* wesentlich befördert.

Bierwürze, selbst in den bei Kriegsbieren gewöhnten Konzentrationen, enthält genügend Wuchsstoffe. Die mangelhafte Vermehrung der Hefe in solchen Würzen ist also nicht auf ein Fehlen von Wuchsstoffen, sondern auf eine zu geringe Konzentration an Nährstoffen zurückzuführen. Das Mitvermaischen von Rohfrucht und vor allem Zucker erniedrigt zwar den Wuchsstoffgehalt der Würze aber niemals in dem Maße, daß dadurch ein Mangel an Wuchsstoffen sich bemerkbar machen könnte. Eher ist hier daran zu denken, daß dadurch sich das Verhältnis von Zucker zu assimilierbarem Stickstoff derart verschiebt, daß das Wachstum der Hefe herabgesetzt wird, besonders wenn die Hefe öfters hintereinander in solchen Würzen geführt wird.

Eine ausgezeichnete Quelle von Wuchsstoffen stellen die Malzkeime dar, weshalb man sie auch mit Vorliebe bei der Preßhefenerzeugung zur Erhöhung des Wuchsstoffgehaltes der daran ärmeren Melassemaische verwendet.

3. Stickstoffaufnahme durch die Hefe. Einfluß der N-Konzentration.

Wie bereits eingangs dieses Abschnittes D erwähnt, besteht zwischen der Intensität des Stoffwechsels und der Größe des Stickstoffumsatzes eine Parallelität. Die ältere Literatur über den Stickstoffwechsel der Hefe findet sich bei Iwanoff und Krupkina (215).

In neuerer Zeit verfolgte Nielsen (216) in einer interessanten Studie die zeitliche Aufnahme des Stickstoffs durch sich vermehrende Hefe.

Trägt man die Stickstoffkonzentration der Hefe in Abhängigkeit von der Zeit graphisch auf, so ergibt sich eine Kurve, die in den ersten 10—12 Stunden, also zu einer Zeit, wo die Vermehrung noch nicht in Erscheinung tritt, steil ansteigt, dann aber sogleich ebenso

steil wieder absinkt. Das Maximum des dabei erreichten N-Gehaltes der Hefe liegt etwa bei 12% der Trockensubstanz, bei einem Ausgangs-N-Gehalt von 8%. Im Stadium der lebhaftesten Vermehrung fällt der Stickstoffgehalt der Hefe schnell wieder bis auf die Hälfte des erreichten Maximums, also auf 6—6,5% ab. Das Minimum wird etwa bei 72 Std. erreicht. Zu dieser Zeit erreicht die Trockensubstanzkurve ihr Maximum, die Hefevermehrung ist also beendet. In den weiteren 9 Tagen steigt dann der Stickstoff der Hefetrockensubstanz wieder bis auf etwa 8% an.

Faßt man die gesamte Stickstoffmenge ins Auge, die von der Hefe aus der Würze aufgenommen wird, so erhält man eine beständig ansteigende Kurve, die schließlich konstant bleibt, da dem Abfall des Stickstoffgehaltes in der Trockensubstanz die Zunahme der absoluten Hefenmenge entgegenwirkt. Die Abnahme der Trockensubstanz kommt im wesentlichen dadurch zustande, daß nicht stickstoffhaltige Reservestoffe, mit denen sich die Hefe anfänglich angereichert hatte, dissimiliert werden, sodaß der Stickstoffgehalt ansteigen muß. Daß die Stickstoffaufnahme der Hefe vor der eigentlichen Vermehrung mit dem folgenden Wachstum in funktioneller Beziehung steht, ist damit beweisbar, daß eine z. B. infolge Wuchsstoffmangel trotz reichlichem Stickstoffangebot nicht wachsende Hefe auch keine Stickstoffanreicherung erfährt.

Die Hefe nimmt also die Hauptmenge des Stickstoffs bereits in sehr frühen Stadien vor ihrer kräftigen Vermehrung und Gärung auf. Dies hat außer den genannten Forschern schon sehr früh M. Hayduck (217) gefunden und Mohr (218) bestätigt, wie folgende Übersicht zeigt.

von Hefe aufgenommener N

Angestellte Maische	0%
Beginnende Hauptgärung	33,0%
Beendete Hauptgärung	35,4%
Vergorene Maische	36,1%

Bei beginnender Hauptgärung hat aber die Zellvermehrung bereits ihr Ende erreicht, weitaus die Hauptmenge des Stickstoffs war in dieser Zeit bereits aufgenommen worden.

Hartelius (239) stellt in neuerer Zeit ebenfalls fest, daß die Hefe in Perioden des intensivsten Wachstums am meisten Stickstoff aufnimmt, aber auch abgibt. d. h. daß der Stickstoffumsatz von der Stoffwechselintensität abhängt. Die Abnahme der N-Ausscheidung mit Fortschreiten der Gärung ist auf eine Ansammlung von Säuren

im Nährsubstrat zurückzuführen, denn ein Zusatz von Säure zur Nährlösung führt in Übereinstimmung damit zu einer Verminderung der N-Ausscheidung. Zunehmender Wuchsstoffgehalt erniedrigt die N-Ausscheidung.

Was die Aufnahme des Stickstoffs unter dem Einfluß von Wuchsstoffen anbelangt, so haben hierüber in neuerer Zeit Nielsen und Dagys (cit. bei Nielsen (208)) Versuche mit β -Alanin als Wuchsstoff angestellt. Als Stickstoffquelle ist das β -Alanin ungeeignet, sein Stickstoff wird nicht verwertet, trotzdem aber werden die geringen Mengen β -Alanin, die in der Würze z. B. vorhanden sind (0,5 γ in 1 ccm) von Hefe beim Schütteln mit der Würze weitgehend aufgenommen.

Obwohl die wachstumsfördernde Wirkung des β -Alanins sich erst nach 16—18 Stunden zeigt, veranlaßt ein Zusatz von β -Alanin bereits nach 12 Stunden eine deutliche Zunahme des Stickstoffgehaltes der Hefe z. B. von 8,4 auf 9,5%. Auch diese Tatsache spricht wieder dafür, daß die gesteigerte N-Aufnahme das Vorstadium des Wachstums darstellt.

Die Wirkung des β -Alanins ist eine außerordentliche. Nielsen und Dagys fanden, daß 1 Teil β -Alanin-Stickstoff auf 7 000 Teile Ammoniakstickstoff maximales Hefewachstum hervorruft. Für die Stickstoffassimilation ist demnach das β -Alanin von unwesentlicher und zu vernachlässigender Bedeutung, während es als Wuchsstoff infolge seiner Beziehungen zur Pantothersäure von größter Bedeutung ist. Weitere Einzelheiten über die Stickstoffausscheidung durch Hefe werden bei Besprechung der Praxisgärung gebracht werden.

Was nun den Einfluß der Menge des dargebotenen Stickstoffs anbelangt, so ist hier vor allem das Verhältnis von Stickstoff zu gleichzeitig vorhandenen vergärbaren Kohlehydraten zu berücksichtigen. Da Bau- und Betriebsstoffwechsel enge gekoppelt sind, wird es verständlich, daß bei ausreichendem Stickstoff- aber ungenügendem Zuckerangebot, ebenso die Hefevermehrung beeinträchtigt wird wie im umgekehrten Fall. Hält man den Zuckergehalt konstant und im Überschuß, so äußert sich nach Rubner eine abgestufte Stickstoffgabe in einer abgestuften Hefevermehrung und zwar besteht zwischen der Hefenernte, ausgedrückt in ihrer Gesamtmasse (gepreßt) oder auch durch ihren Stickstoffgehalt und dem Stickstoffgehalt der Würze eine befriedigende Proportionalität, sodaß man hier also auch das aus Düngeversuchen in der Landwirtschaft bekannte Gesetz vom Minimum wiederfindet, demzufolge auf unser Beispiel angewandt, bei Zuckerüberschuß der Stickstoff der limitierende Fak-

tor ist. Daß nicht unbedingt die vorher erwähnte Proportionalität unter allen Umständen zu Recht bestehen muß, erklärt sich daraus, daß bei N-Mangel die Hefe auch sonst schwer assimilierbare Stickstoffarten anzugreifen vermag, und daß sie in Notzeiten, wie jeder Organismus, sich auf ein dem Nahrungsangebot angepaßtes Gleichgewicht in gewissen Grenzen einzustellen vermag d. h. stickstoffärmer wird. Diese Verarmung an Stickstoff hat aber wie eingangs dieses Abschnittes schon einmal erwähnt wurde ihre Grenzen, insoferne bei Unterschreiten einer gewissen Schwelle zuerst das Vermehrungsvermögen ausfällt, schließlich auch das Gärvermögen erlischt und endlich die Zelle unter Autolyseerscheinungen dem Tode anheimfällt.

Die vielfachen Untersuchungen, welche von verschiedenen Seiten über die Hefenernte in Abhängigkeit von der Stammwürzekonzentration durchgeführt wurden, haben zwar mit Rücksicht auf die Praxis der Dünnbierbereitung ein erhebliches Interesse, berühren jedoch unsere Probleme nicht, da mit Abnahme der Stammwürzekonzentration das Verhältnis Kohlehydrate : Stickstoff sich praktisch nicht ändert.

Von Interesse ist dagegen die Feststellung von Heß (219) und von Kolbach und Strömberg (220), daß bei Zuckerzusatz zu schwachprozentigen Würzen die Hefeernte erhöht wird, was beweist, daß das Verhältnis von Kohlehydraten : N nicht das günstigste ist, sondern der Stickstoff im Überschuß vorliegt. Dies geht übrigens auch daraus hervor, daß nach beendigter Gärung noch ein erheblicher Teil assimilierbaren Stickstoffs im Bier vorliegt, also Mangel an vergärbarem Zucker die Assimilation des Stickstoffs und damit die Hefenernte limitiert.

Zum Schlusse dieses Kapitels sei mit einigen Bemerkungen noch auf den Einfluß des Stickstoffgehaltes der Hefe auf ihre Gärleistungen eingegangen.

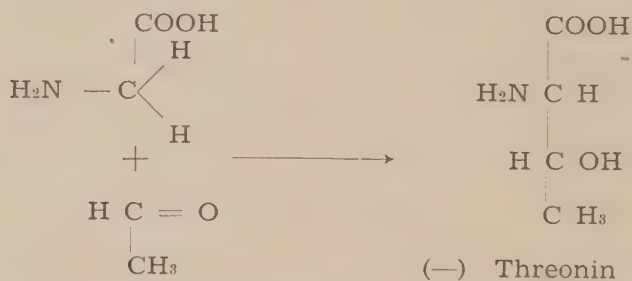
Durch Beobachtungen an der Preßhefe weiß man schon seit langer Zeit (M. Hayduck (221)), daß die Gärkraft der Hefe mit ihrem Stickstoffgehalt parallel geht z. B.

5 g Preßhefe mit 1,5% N liefern in 24 ^h bei 30°	8,4 g CO ₂
5 g „ „ 2,1% „ „ „ 24 ^h „ 30°	11,8 g CO ₂
5 g „ „ 2,4% „ „ „ 24 ^h „ 30°	14,2 g CO ₂

• Schönfeld und Hirth (222) fanden diese Tatsache auch an untergäriger Brauereihefe bestätigt. Hefen mit 65—67% Eiweiß in der Trockensubstanz lieferten z. B. 1150—1250 ccm Kohlensäure, solche

mit 56–62% Eiweiß unter den gleichen Bedingungen nur 715 bis 902 ccm CO₂. Wie Rubner nachweisen konnte (siehe Wachstum und Stickstoff) verliert eine Hefe, welche sich nicht vermehrt und trotzdem noch gärt, von Führung zu Führung Stickstoff, wobei die Gärleitung von Tag zu Tag geringer, die Hefe immer träger wird.

Durch Arbeiten Eulers und Mitarbeiter (223) ist bekannt geworden, daß es auch Stickstoffverbindungen gibt, welche das Wachstum der Hefe nicht beeinflussen, aber bereits in geringster Menge die Gärung zu stimulieren vermögen. Dieser bislang in seiner Konstitution unbekannte „Z-Faktor“ genannte Wirkstoff wurde neuerdings von Kögl und Borg (224) näher untersucht, wobei sich herausstellte, daß Threonin (β -oxy- α -Aminobuttersäure) sich durch eine besondere Gärbeschleunigung auszeichnete. Da auch Glycocoll von untersuchten Aminosäuren sich durch eine besonders ausgeprägte Gärbeschleunigung auszeichnete, kann angenommen werden, daß es zusammen mit dem bei der Gärung auftretenden Acetaldehyd nach Art einer Aldolkondensation zu Threonin zusammentritt:



b) Die Gärung in der Praxis.

1. Die Stickstoffverhältnisse bei der Gärung.

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, sind nach Nielsen bei Überschuß an Zucker etwa 34 bis 55% des Gesamtwürzestickstoffs von der Hefe assimilierbar, jedoch werden unter praktischen Verhältnissen nur etwa 30%, oft auch noch weniger assimiliert, so daß das Bier noch beträchtliche Mengen (30–36%) des Gesamtstickstoffs in assimilierbarer Form enthält.

Windisch, Kolbach und Schild (225) untersuchten die Verteilung des assimilierbaren Stickstoffs auf einzelne N-Fractionen mit folgendem Ergebnis.

In Prozenten des assimilierten Gesamtstickstoffs berechnet sich der assimilierte Formolstickstoff zu 59,3 und der assimilierte Ammoniak-

Stickstoff zu 11,7%. Da der formoltitrierbare Stickstoff aus Amino- und Ammoniakstickstoff besteht, kann man den insgesamt assimilierten Stickstoff aufteilen in $100 - 59,3 = 40,7\%$ nicht formoltitrierbaren Stickstoff, $59,3 - 11,7 = 47,6\%$ Amino-Stickstoff und 11,7% Ammoniak-Stickstoff. Der Wert für den nicht formoltitrierbaren Stickstoff umfaßt auch den bei der Gärung ausgeschiedenen (koagulierten) Stickstoff, sodaß der wirklich assimilierte nicht formoltitrierbare Stickstoff etwas niedriger ist. Aus dem Gehalt von Würze und Bier an Gesamt-Formol- und Ammoniak-N ergibt sich folgende Differenzierung der Stickstoffsubstanzen bei der Gärung.

Art des N.	mg Würze	in 100 ccm Bier assimiliert		assimilierter N in % des entsprechenden Würze N
nicht formol- titrierb.	59,2	50,2	8,5	14,4
Amino-N	28,1	18,1	10,0	35,6
Ammoniak-N.	3,23	0,78	2,45	75,8

Der Aminostickstoff umfaßt alle formoltitrierbaren Aminosäuren, die der Carboxylgruppe äquivalente Aminogruppe der Diaminosäuren, ebenso solche Aminogruppen der Peptide und höheren Eiweißsubstanzen, sofern sie einer Carboxylgruppe entsprechen. Der nicht formoltitrierbare Stickstoff kann als ein Maß für den „kolloiden“ Stickstoff betrachtet werden, doch ist er mit diesem nicht identisch, da er z. B. auch den nicht formoltitrierbaren Stickstoff von Polypeptiden (NH-Gruppen) und NH_2 -Gruppen von Diaminosäuren umfaßt.

Die Prozentwerte der vorangehenden Tabelle lassen erkennen, daß als Ganzes genommen der nicht formoltitrierbare Stickstoff am wenigsten assimiliert wird, dann folgt der Aminostickstoff und schließlich der Ammoniak-Stickstoff.

Bei stickstoffärmeren Würzen wird im Vergleich zu stickstoffreicheren etwas mehr assimiliert und zwar aus der Fraktion des Aminostickstoffs.

Der zeitliche Verlauf der Stickstoffassimilation geht aus folgender Tabelle, die einer Veröffentlichung von Windisch, Kolbach und Schild (226) entnommen ist, hervor.

Gärtage	mg in 100 ccm					
im Bottich	Ges.-N.	assimilierb.	Formol-N.	assimil.	NH ₃ N.	assimil.
0	105,0	0	35,2	0	4,03	0
1	100,2	4,8	33,1	2,1	4,00	0,03
3	89,6	15,4	29,8	5,4	3,57	0,46
6	82,6	22,4	25,6	9,6	2,52	1,51
9	82,7	22,3	25,7	9,5	2,44	1,59

Die intensivste Assimilation erfolgt somit in den ersten drei Gärtagen und fällt damit mit dem Stadium der Hefenvermehrung zusammen. Nur die Assimilation des Ammoniakstickstoffs erfolgt etwas langsamer.

Eine weitere Differenzierung des assimilierbaren Stickstoffs wurde von Kolbach und Göpp (227) auf dem Wege fraktionierter Fällungen vorgenommen:

Auf 12%ige Stammwürze berechnet.

	Isaria		Hado-Streng	
	Würze	Bier	Würze	Bier
Gesamt-N.	125,3	103,0	131,1	106,8
koagul. N.	1,83	1,87	2,38	2,14
Mg SO ₄ -N.	23,0	18,7	24,3	20,1
Tannin-N.	24,4	20,2	29,1	23,1
Formol-N.	44,4	32,3	45,3	32,5.

Magnesiumsulfat- und Tanninstickstoff bilden ein Maß für den höhermolekularen (kolloiden) Stickstoff. Während der Gärung verschwinden diese beiden Stickstoffgruppen nur in geringfügigem Maße, verglichen mit dem formoltitrierbaren Stickstoff. Dabei ist ein erheblicher Anteil dieser Stickstofffraktionen nicht assimiliert, sondern in den Decken ausgeschieden worden. Auffallend dagegen ist, daß der koagulierbare Stickstoff sich nicht oder nur unwesentlich veränderte, obwohl man gerade für ihr in erster Linie eine Ausscheidung annehmen sollte.

Wie aber Kolbach und Wilharm (227) früher zeigten, kann man auch eine deutliche Abnahme des koagulierbaren Stickstoffs z. B. von 1,85 auf 1,45 mg oder von 1,83 auf 1,57 mg in einem andern Fall feststellen. Dabei spielt die während der Gärung erfolgende pH-Erniedrigung noch eine Rolle, da hierdurch die Koagulierfähigkeit dieses Stickstofftyps abnimmt z. B. zeigte Bier, dessen pH mit Natronlauge oder Salzsäure verschoben wurde, folgende Werte an koagulierbarem Stickstoff:

pH	5,61	1,57 mg in 100 ccm
	4,89	1,47 „ „ 100 „
	4,52	1,41 „ „ 100 „
	4,14	1,28 „ „ 100 „

Das bedeutet also, daß der im Bier bei seinem wirklichen pH analytisch ermittelte Gehalt an koagulierbarem Stickstoff zu niedrig ausfällt: Daß der koagulierbare Stickstoff bei der Gärung sogar ansteigen kann, darauf wird weiter unten bei der Ausscheidung des Stickstoffs aus der Hefe noch eingegangen werden.

Bezüglich weiterer Fraktionierungsversuche des hochmolekularen Stickstoffs in Würze und Bier sei auf Veröffentlichungen von Stadnik (228) und Fink und Wildner (229) verwiesen, wobei entweder die Kohleadsorbierbarkeit oder die Tanninfällbarkeit des Stickstoffs verwertet wurde. Diese Versuche lassen erkennen, daß während der Gärung Änderungen in den Stickstoffgruppen erfolgen, welche nicht allein auf eine Assimilation, sondern auch auf eine Veränderung des Dispersitätsgrades derselben hindeuten. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Windisch, Kolbach und Wentzel (loc. cit. 116) auf Grund von Ultrafiltrationsversuchen, die zu den in folgender Tabelle verzeichneten Ergebnis führten:

	Vor der Gärung	nach der Gärung
löslicher N.	701 mg	427 mg
N in 1½%igem Ultrafiltrat	556 „	419 „
N in 3 „ „	539 „	385 „
N in 4½ „ „	523 „	323 „
N in 4½ „ „	532 „	323 „
N in 6 „ „	565 „	309 „
N in 7½ „ „	431 „	271 „

Es sinkt zunächst einmal der gesamtlösliche Stickstoff von 701 auf 427 mg in 100 g Maltztrockensubstanz. Weiterhin aber findet nach der Hauptgärung eine Anreicherung der Fraktionen 1½—3 und 3—4½% (Kollodiumfilter) statt. Das durch den Hopfenkochprozeß infolge der Gerbstoffwirkung gestörte Gleichgewicht zwischen den Eiweißstoffen der einzelnen Dispersitätsgrade hat sich auf Kosten des feindispersen Eiweißes wieder eingestellt. Faßt man die einzelnen N-Gruppen in größere Anteile zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

	vor der Gärung	nach der Gärung
koaguliert bzw. assimiliert	0	274
nicht ultrafiltrierbar	270	156
ultrafiltrierbar	431	271
Summe	701	701

Rund 40 % des Stickstoffs sind also durch Assimilation und Ausscheidung aus der Würze entfernt worden. Durch Vergleich einer Gärung mit ungehopfter Würze konnten die Autoren nachweisen, daß die Hopfenharze eine stabilisierende Wirkung auf die Dispersitätsgradverschiebung ausüben, die aber nur von kurzer Dauer ist. Denn bei der Lagerung strebt die Dispersitätsgradvergrößerung endlich einem annähernd gleichgearteteten Gleichgewichtszustand zu. Auch ließ sich zeigen, daß die Säuerung der Würze auf das pH nach der Gärung ebenfalls große Veränderungen des Dispersitätsgrades der Eiweißstoffe zur Folge hat, womit der Einfluß der Aziditätssteigerung bei der Gärung auf die genannten Prozesse erwiesen ist.

Neben diesen Versuchen, Einblick in die Veränderungen des hochmolekularen Stickstoffs bei der Gärung zu gewinnen, finden wir in letzter Zeit auch das Gegenteil vor, nämlich die Assimilation des niedrigmolekularen Aminostickstoffs zu verfolgen. Lüers, Stricker und Schild (l. c. 112) untersuchten die Veränderungen, welche einzelne Aminosäuren, die sich einwandfrei kolorimetrisch bestimmen lassen, während der Gärung erfahren. Mit Hopfen gekochte Laboratoriumswürzen wurden einmal mit sehr wenig Hefe (eine Platindrahtöse), das andere Mal mit 2 g Hefe auf 350 ccm Würze angestellt und 10 Tage bei 9° vergoren. Dadurch sollte der Einfluß starker und schwächerer Assimilation aufgeklärt werden. Außer den verschiedenen Stickstofffraktionen wurden die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Arginin, wie erwähnt, kolorimetrisch ermittelt. Die Ergebnisse enthält folgende Tabelle:

In 100 g Malz- trockensubstanz	nach Gärung		Veränderungen in %	
	Würze	mit wenig	mit viel	mit wenig mit viel Hefe
löslicher N	65,0	50,8	49,3	—22 —24
koagulierb. N	2,0	3,9	2,1	+90 + 5
dauernd lösl. N	63,0	46,9	47,2	—26 —25
Formol N.	18,6	14,0	14,9	—25 —20
Tyrosin	10,2	8,1	8,3	—21 —19
Tryptophan*)	2,63	0,57	1,42	—79 —46
Arginin	13,0	11,4	11,2	—13 —14
Summe des reakt.- fähig. N der 3 Ami- nosäuren	1,85	1,55	1,55	—16 —16

Die Versuche zeigen, daß die Assimilation des Formolstickstoffs, sowie von Tyrosin und Tryptophan bei kräftiger Hefevermehrung eine stärkere ist, als bei schwacher. Im Falle großer Hefenaussaat wird nicht nur weniger Stickstoff zum Aufbau von Zellmaterial verbraucht, sondern auch von den absterbenden Hefezellen Stickstoff an die Nährlösung abgegeben. Im Gegensatz zu den beiden Aminosäuren mit aromatischem Kern, nämlich Tyrosin und Tryptophan, die für das Zelleben anscheinend sehr wichtig sind, wird das Arginin bedeutend weniger assimiliert, was wahrscheinlich auf die lange Kohlenstoffkette des bei der Spaltung durch Arginase entstehenden Ornithins zurückzuführen ist. Versuche mit Malz vor und nach dem Abdarren zeigten, daß die Assimilierbarkeit der einzelnen Aminosäuren, aber auch einzelner Stickstoffgruppen, durch den Darrprozeß ziemlich stark in ungünstigem Sinne verändert wird, wofür folgendes Beispiel (Gärung mit wenig Hefe) dienen möge:

	% Veränderung bei der Gärung	
	7 Std. vor Darren	Darrmalz
löslicher N	—29	—22
koagulierbarer N	+90	+90
dauernd lösl. N	—33	—26
Formol N.	—40	—25
Tyrosin	—34	—21
Tryptophan	—79	
Arginin	—26	—13

*) Die Tryptophanwerte sind Versuchen mit Malzen vor dem Ausdarren entnommen.

Durch die Melanoidinreaktion beim Darren wird sicherlich Stickstoff, der sonst für die Assimilation zur Verfügung steht, infolge der Kondensation mit Zuckern in eine nicht assimilierbare Form übergeführt.

Um die im Laboratorium gewonnenen Ergebnisse auch in der Praxis zu bestätigen, wurde die Gärung einer hellen Exportbierwürze vom Kühlschiff bis zum Ausstoß mit folgendem Resultat verfolgt.

mg N in 100 ccm	Kühl- schiff	Würze aus Gärbottich					beim nach 2½ Schlau- Mon. chen Lage- 7. Tag rung	
		1.	2.	3.	4.	6. Tag	7. Tag	
löslicher N.	88,7	87	80,25	77	73,5	71,7	71,0	75,6
Formol-N	32,4	30,6	28,4	25,8	24,5	21,9	20,1	22,8
Tyrosin	24,0	22,2	20,0	18,9	15,0	13,7	13,4	18,4
Tryptophan	4,0	3,6	2,7	2,5	2,4	2,3	1,9	1,7
Arginin	13,1	12,7	12,0	11,2	10,9	11,1	10,5	13,8
Summe des reaktionsf. N der Aminosäuren	3,2	3,0	2,71	2,57	2,22	2,12	2,02	2,67

Daraus ist folgendes zu ersehen: Löslicher und Formolstickstoff, sowie die drei untersuchten Aminosäuren nehmen bei der Gärung ab und zwar erfolgt die prozentuale Abnahme an Aminosäuren und Formolstickstoff nach 7tägiger Gärdauer in ähnlicher Weise, wie bei den vorher beschriebenen Gärversuchen mit Laboratoriumswürze. So nimmt von den Aminosäuren das Tyrosin um 46 %, das Tryptophan um 53 % und das Arginin um 20 % von der Anstellwürze zum Jungbier ab, während die Abnahme des Formol-Stickstoffs als ganzem 38 % beträgt.

Es zeigt sich auch hier, daß der Formolstickstoff, ganz besonders Tryptophan und Tyrosin ausgezeichnete Stickstoffquellen für die Hefe darstellen, während das Arginin durch seine geringere Assimilierbarkeit auch hier wieder auffällt.

Hinsichtlich der Abnahme von Tyrosin und Tryptophan bei der Gärung muß noch eine kritische Bemerkung gemacht werden. Bei den chemischen Leistungen der Hefezelle wurde auf die Aminosäuregärung hingewiesen, wonach die Aminosäuren in die um ein Kohlenstoffatom ärmeren Alkohole übergehen. Aus dem Tryptophan entsteht dabei Tryptophol, aus dem Tyrosin das Tyrosol, die beide ebenso wie die entsprechenden Aminosäuren die Farbreaktionen mit Ehrlichs- und Millions Reagens liefern. Aus diesem Grunde

lassen die Gärversuche streng genommen keine Entscheidung darüber zu, ob Tyrosin und Tryptophan assimiliert, oder zu höheren Alkoholen vergoren wurden, oder inwieweit beide Prozesse nebeneinander stattgefunden haben. Wäre nur eine Vergärung zu höheren Alkoholen erfolgt, dann dürften sich die Konzentrationen von Tyrosin und Tryptophan während der Gärung nicht nennenswert ändern; da aber gerade diese beiden Aminosäuren besonders stark während der Gärung abgenommen haben, müssen sie assimiliert oder biochemisch so verändert worden sein, daß ihre Umwandlungsprodukte nicht mehr die Millionsche und Ehrlichsche Reaktion geben. Die zwangloseste und sicher zutreffendste Annahme ist die ihrer Assimilation.

Wie schon vorher angedeutet wurde ist der Grad der Stickstoffassimilation von der Intensität des Hefewachstums abhängig, wofür schon eine Reihe von Beispielen bei den allgemeinen Betrachtungen gebracht wurden. Alle Faktoren, welche demgemäß die Vermehrung der Hefe begünstigen, sind auch geeignet, die Stickstoffentnahme aus der Würze zu befördern, so insbesondere Belüftung, Bewegung, Spänung, geringe Hefenaussaat, Verwendung hungriger, eiweißarmer Hefe und Gärführung bei höherer Temperatur. Will man dem Bier den Stickstoff erhalten, muß man die kalte Gärführung, bei der sich die Hefe weniger stark vermehrt und auch die Ausscheidungsvorgänge langsamer und schonender verlaufen, wählen. Ein Beispiel für den Einfluß der Temperatur gibt folgende von K. Geys (231) stammende Tabelle.

Anstellwürze 100,8 mg N in 100 ccm			
normale Führung		kalte Führung	
Anstellen	35° R.	Anstellen	4,1° R.
Max. Temp.	7,1° R.	Max. Temp.	6,1° R.
Jungbier nach			
3 Tagen	87,92 mg	90,16	
4 „	81,76 „	85,88	
5 „	76,16 „	84,00	
7 „	73,92 „	80,64	
8 „	73,92 „ (Fassen)	—	
10 „	—	80,08 (Fassen)	

Trotzdem die beiden Führungen sich in der Maximaltemperatur nur um einen Grad unterscheiden, sind die Unterschiede in der Herausnahme des Stickstoffs aus der Würze auffallend große, was wiederum beweist, daß die Temperatur bei der Gärung ein sehr wirksames

Mittel darstellt, Beeinflussungen besonders physiologischer Art zu erzielen. Es soll aber auch hier wieder darauf hingewiesen werden, daß die in obiger Tabelle verzeichneten Werte über die Stickstoffabnahme während der Gärung sowohl durch Assimilation als auch durch physikalisch-chemische Ausscheidung zustande kommen. Auf die Ausscheidung von Stickstoff auf physikalisch-chemischem Wege wird im nächsten Kapitel eingegangen werden. Dagegen soll hier zum Abschluß dieser Erörterungen noch die Dissimilation von Stickstoffverbindungen aus der Hefe betrachtet werden, nachdem bisher das Hauptaugenmerk auf die Assimilation des Stickstoffs gelegt wurde.

Auch über dieses Gebiet wurde im Laufe der Zeit viel gearbeitet. Schon Pasteur z. B. war es bekannt, daß die Hefe während der Gärung nicht nur Stickstoff aufnimmt, sondern auch abgibt. Lampitt (232) fand beim Verbringen von Hefe in Wasser oder N-freie Zuckerlösung, daß die Hefe sehr bedeutende Mengen von Stickstoff z. B. in 10 Tagen 24,85 bis 37,85 % ihres Stickstoffs ausscheidet, wobei der Nachweis, daß die Hefen leben, erbracht wurde. Der größere Teil des ausgeschiedenen Stickstoffs ist durch Phosphorwolframsäure fällbar und wird von Hefe nur teilweise wieder verwertet, etwa $\frac{1}{3}$ entzieht sich der Assimilation. Lampitt fand weiterhin, daß die Stickstoffausscheidung der Hefe durch Gärung befördert wurde, also an Lebensprozesse gebunden war. Diese Feststellung wurde durch Iwanoff und Krupkina (1. c. 215) bestätigt (dortselbst ausführliche Literatur), die zeigen konnten, daß in Nährlösungen, welche kräftige Gärung verursachen, die Stickstoffausscheidung deutlich nachweisbar ist, während sie in Lösungen, welche unvergärbare Kohlehydrate enthalten, in den Zeiten, in welchen noch keine Autolyse eintritt, nicht nachweisbar ist. Die N-Ausscheidung ist also an das Ablaufen der Lebensprozesse gebunden. Euler und Sandberg (233), sowie Euler und Fink (234) fanden im Gegensatz zu Iwanoff bedeutend geringere Stickstoffausscheidung der Hefe während der Gärung.

Die analytischen Schwierigkeiten zwischen assimiliertem und ausgeschiedenem Stickstoff zu unterscheiden, sind sehr große. Sie dadurch lösen zu wollen, daß man die Hefe in reines Wasser oder reine salz- und stickstofffreie Zuckerlösungen verbringt, bringt eine so starke Veränderung der natürlichen Bedingungen mit sich, daß solchen Versuchen die Beweiskraft fehlt. M. Hayduck (235) suchte diese Schwierigkeiten methodisch dadurch zu umgehen, daß er als Stickstoffsubstanz in der Nährlösung Asparagin verwandte und aus dem analytisch bestimmten Gesamt-N abzüglich des ebenfalls be-

stimmten Asparagin N den von der Hefe ausgeschiedenen Stickstoff ermittelte, wobei vorausgesetzt wurde, daß von der Hefe kein Asparagin an die Lösung abgegeben wurde. Nach einer ähnlichen Methode stellte Pringsheim (236) fest, daß die Stickstoffausscheidung der Hefe in Anwesenheit von Stickstoffverbindungen in der Nährlösung gefördert wird. Thorne (237) schließlich fand mit einer ähnlichen Methode, daß etwa 33 % des von der Hefe während ihres Wachstums assimilierten Stickstoffs wieder ausgeschieden werden.

Nielsen und Hartelius (238) nahmen in jüngster Zeit die Versuche zwecks endgültiger Klärung des Sachverhaltes nochmals auf. Sie verwendeten als Stickstoffquelle Ammonsulfat, nachdem sie entgegen älteren Befunden in der Literatur nachgewiesen hatten, daß die Hefe keinen Ammoniakstickstoff auszuschcheiden vermag. Damit ergibt sich aus der Differenz von analytisch ermitteltem Gesamt-N und Ammoniak-N der von der Hefe ausgeschiedene Stickstoff. Steht der Hefe nur ungenügend Ammoniakstickstoff zur Verfügung, was zur Folge hat, daß sich der Zellstickstoff auf 2,5—3 % senkt, so scheidet sie während ihrer Vermehrung etwa 10 % des assimilierten Stickstoffs aus. Liegt dagegen der Ammoniakstickstoff im Überschuß in der Nährlösung vor, so stellt sich der Zellstickstoff auf 5—6 % ein und die Hefe scheidet während ihres Wachstums etwa 33 % des assimilierten Stickstoffs wieder aus. Weiterhin zeigte sich, daß die Stickstoffausscheidung der Hefe in der Periode ihres stärksten Wachstums am größten ist, woraus man in Übereinstimmung mit den oben erwähnten Autoren schließen muß, daß die Stickstoffausscheidung eine Folge des Stoffwechsels der Hefe ist. In der Periode, in welcher mit dem Verzehr des Zuckers das Wachstum der Hefe aufhört, aber noch keine Autolyse einsetzt, findet keine nennenswerte Stickstoffausscheidung mehr statt. Nach Beginn der Autolyse, die sich in einer Gewichtsabnahme der Hefe äußert, wird dann wieder mehr Stickstoff ausgeschieden. Die Art der Stickstoffverbindungen, welche während des normalen Stoffwechsels und der Autolyse von der Hefe abgegeben werden, dürfte eine verschiedene sein. Die durch Autolyse ausgeschiedene Stickstoffmenge ist abhängig vom Stickstoffgehalt der Hefe. Eine stickstoffreiche Hefe schied in 28 Tagen 69 %, eine stickstoffarme dagegen nur 10 % ihres Stickstoffgehaltes aus.

Hartelius (239) fand, daß die Stickstoffausscheidung der Hefe stark von der Gegenwart von Wuchsstoffen abhängig ist. Während diese die N-Assimilation nicht oder nicht merklich beeinflussen, setzen sie mit steigender Konzentration die Ausscheidung mehr und mehr herab. Auch die während der Gärung auftretenden Säuren verringern die N-Dissimilation, was Hartelius dadurch beweisen konnte,

daß er Würze auf das pH des Bieres einstellte und damit trotz gleicher Assimilation eine verminderte Dissimilation des Stickstoffs erhielt.

Ein Teil des ausgeschiedenen Stickstoffs kann von der Hefe wieder assimiliert werden. Bei größeren Hefegaben spielt demgemäß der von den immer in größerer oder geringerer Menge vorhandenen toten Zellen abgegebene Stickstoff für die Stickstoffernährung der wachsenden Zellen eine gewisse Rolle. Durch die Tatsache der teilweisen Verwertbarkeit ihres eigenen ausgeschiedenen Stickstoffs durch die Hefe erscheinen die analytisch gefundenen Mengen ausgeschiedenen Stickstoffs eher zu niedrig zu sein.

Über die chemische Natur der Stickstoffausscheidungen ist man noch wenig unterrichtet. Wie bereits oben erwähnt, wird Ammoniak-Stickstoff nicht ausgeschieden. Ein Teil des dissimilierten Stickstoffs liegt sicher in Aminoform vor, denn Thorne (10 c. cit. 237) fand 17 % vom Totalstickstoff als Aminostickstoff. Dieser dürfte es auch sein, der in erster Linie der Hefe zum Teil wieder als Nahrung dienen kann. Außerdem fand Lampitt (10 c. cit. 232) etwa 33 % des Stickstoffs durch Phosphorwolframsäure fällbar, also wohl schon von höhermolekularer Form.

Eine strittige Frage dagegen ist die, ob die Hefe auch hochmolekularen, koagulierbaren Stickstoff auszuscheiden vermag. Nielsen (240) untersuchte Würzen, welche nach Kolbach restlos vom koagulierbaren Stickstoff befreit waren, nach der Gärung auf solchen, ohne welchen zu finden. Auch praktische Versuche an zahlreichen Gärungen der Carlsbergbrauereien ergaben keine Zunahme desselben nach der Hauptgärung. Wie bereits weiter oben bei der Assimilation des Stickstoff in einigen Tabellen zu ersehen war, nimmt der koagulierbare Stickstoff bei der Gärung etwas ab, manchmal aber auch geringfügig zu (siehe Lüers, Stricker und Schild). Es scheint so zu sein, daß während der Hauptgärung aus der gesunden, gut ernährten Hefe keine koagulierbaren Eiweißstoffe in die Würze diffundieren.

Wenn jedoch die Hefe abstirbt und der Autolyse unterliegt, ist diese Möglichkeit gegeben. Lüers und Landauer (241) fanden bei einmonatlicher Lagerung eine Zunahme des koagulierbaren Stickstoffs, wie folgende Werte zeigen:

	Gesamt-Eiw.	koagulierb.Eiw.	Amid-N
1 hl fässiges Bier	429,1	9,00	24,15
do 1 Monat gelagert	435,8	11,81	24,50

Die Zunahme an koagulierbarem Eiweiß während der Lagerung führen die Autoren auf Ausscheidungen der Hefe zurück. Im Lagerfaß

ist damit zu rechnen, daß ein größerer Teil der Gelägerhefe abstirbt und hochmolekulare Proteine ans Bier abgibt. Daß dieses Eiweiß zusammen mit anderen tatsächlich sich an Trübungen beteiligen kann, wiesen Lüers und Ottensooser (242) auf serologischem Wege an der Pasteurisirtrübung des Bieres nach. Durch Anaphylaxieversuche ließ sich zeigen, daß das Eiweiß, welches in der Pasteurisirtrübung enthalten ist, vorwiegend aus dem Eiweiß der Gerste, daneben aber auch aus Eiweiß der Hefe besteht. Selbst wenn die von der Hefe ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen nicht immer so hochmolekular sind, daß sie koagulieren, so können sie doch so komplex sein, daß sie mit anderen Substanzen (Kieselsäure, Gerbstoffen) zu Trübungen Veranlassung geben und sich im Tierversuch als Antigene erweisen.

Schließlich konnte W. Wöllmer (243) nachweisen, daß aus dem Faßgeläger beim Abpressen ein Bier erhalten wurde, welches beim Zusammenbringen mit gewöhnlichem Bier, trotzdem beide völlig klar waren, Trübungen oder Opaleszenzen lieferte. Das Maximum an Trübung verursachte ein 20 %iger Zusatz des Gelägerbieres. Bereits K. Geys (245) fand, daß das Gelägerbier bedeutend alkalischer ist als das normale Bier, was auch Wöllmer bestätigte. Besonders grünes Schlauchen oder Kräusenzusatz zum Lagerfaß erhöht die Hefemenge im Geläger und gibt damit zu Ausscheidungen aus der Hefe Anlaß. Im Bier sind bis zu 3000 Zellen im mm^3 normal, in solchem Falle hat das Gelägerbier etwa ein pH von 4,7. Bei Kräusenzusatz findet man bis zu 12 000 Zellen/ mm^3 und dann sind pH-Werte in Gelägerbier von bis zu 6 häufig zu beobachten. Unter diesen veränderten pH-Bedingungen geht besonders das Zymocasein in Lösung, das dann beim Vermischen mit Normalbier (pH 4,5) ausfällt. Übrigens ist das Zymocasein, obwohl es ein echtes Protein ist, sehr schwer durch Hitze koagulierbar. Aber auch andere Hefeneiweißkörper sind durch Pasteurisieren schwer und unvollkommen aus dem Gelägerbier zu entfernen. Will man aus Qualitätsgründen nicht auf das Gelägerpreßbier verzichten, so empfiehlt sich Behandeln mit Aktivkohle oder Deglutan.

Jedenfalls dürfte durch diese Versuche nachgewiesen sein, daß die Hefe, wenn sie abstirbt, hochmolekulare Eiweißstoffe an Bier abgibt, welche sich mit anderen Kolloiden an Trübungen beteiligen können.

2. Deckenbildung, kolloide Ausscheidungen.

Während der Gärung beobachtet man die Ausscheidung von Stoffen aus der Würze, bzw. dem Jungbier, die mit dem Lebensprozeß der Hefe, also dem Stoffwechsel nichts mehr zu tun haben. An ihrer Abscheidung sind mechanische und physikalisch-chemische Faktoren beteiligt, z. B. die in der gärenden Würze zur Entfaltung kommenden Oberflächen, die Oberflächenaktivität der sich ausscheidenden Stoffe und die durch die Gärung verursachte pH-Erniedrigung des Milieus.

Wie groß die in Betracht kommenden Oberflächen sind, möge der Hinweis illustrieren, daß bei einer normalen Hefegabe von 0,5 L dickbreiiger Hefe die von der Hefe in einem Hektoliter Würze eingenommene Oberfläche rund 300 qm ausmacht. Die Oberfläche der sich entwickelnden Gärungskohlensäure ist ungleich größer, außerdem erneuert sie sich fortgesetzt, solange die Gärung anhält. Nach den bekannten von Gibbs und Thompson gegebenen thermodynamischen Ableitungen reichern sich in den Oberflächen vor allem jene Stoffe an, welche zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung Anlaß geben, nämlich oberflächenaktive Stoffe. Die Konzentrationserhöhung, welche diese letzteren in den Oberflächen erfahren, zugleich mit den durch selektive Adsorption in den Oberflächen gründlich veränderten Milieubedingungen führen zur Ausscheidung instabiler hochmolekularer Verbindungen. Die Wirkung der bei der Gärung entstehenden und die Würze durchströmenden Kohlensäurebläschen kann man als eine im technischen Ausmaß ablaufende Zerschäumungsanalyse (Wo. Oswald, Siehr und Mischke (246)) bezeichnen. Ein mehrphasiges System von festen Teilchen oder solchen, die zur Koagulation neigen, wird zusammen mit oberflächenaktiven Stoffen von den CO₂-Bläschen in die Kräusen mitgenommen und bildet dort nach dem Zusammenfallen des Schaumes die Decke. Der etwa eine Zehnerpotenz betragende pH-Sturz bei der Gärung (siehe nächsten Abschnitt) wirkt für die Abscheidung instabiler Stoffe begünstigend.

Von den in den Decken vorkommenden Stoffen interessieren hier im Rahmen dieser Betrachtungen vor allem die Eiweißgerbstoffverbindungen, was von Hartong (247) in Gerbstoffbilanzversuchen von der Würze bis zum Bier nachgewiesen wurde. Ebenso wie in den Decken finden sie sich auch in der Bottichhefe, nur ist infolge der geringeren Oberfläche ihre Menge hier geringer. Da die sich während der Gärung ausscheidenden Stoffe, vor allem die Bitterstoffe des Hopfens, aber auch die Eiweißgerbstoffverbindungen die Feinheit des Ge-

schmackes beeinträchtigen und (besonders die letztgenannten) auch die Stabilität ungünstig beeinflussen, erscheinen die Bestrebungen der Praxis verständlich, durch Gär- und Klärbleche, oder durch Adsorptionsmittel, wie Mammuthbiospäne, die Entfernung von Deckenstoffen möglichst zu fördern.

3. Säurezunahme (pH-Sturz) bei der Gärung. Ester, höhere Alkohole.

Wie bekannt und mehrfach erwähnt, findet bei der Hauptgärung eine Zunahme sowohl der titrierbaren als auch der aktuellen Azidität statt mit der Auswirkung, daß sich das pH rund um eine 10er Potenz von der Würze bis zum Jungbier erniedrigt. Die Ursache dieser Säuerung ist in den Stoffwechselvorgängen der Hefezelle zu suchen und zwar, wie schon bei früherer Gelegenheit behandelt wurde, in der Assimilation des Stickstoffs aus Aminosäuren (Aminosäuregärung) und aus Ammoniumsalzen organischer Säuren. Daneben aber spielt auch die Entstehung organischer Säuren bei der Vergärung von Kohlehydraten im sogenannten Bernsteinsäure- oder Zitronensäurezyklus eine gewisse, wenn auch bei der anaeroben, alkoholischen Gärung untergeordnete Rolle. Da eine Reihe parallel laufender biochemischer Vorgänge somit in komplizierter Weise die Säurezunahme bei der Gärung bedingen, wird es verständlich, daß man bisher noch keine befriedigende Proportionalität der Säurezunahme mit einer analytisch verfolgbaren Stoffgruppe, z. B. der Assimilation des Aminostickstoffs feststellen konnte.

Die Auswirkungen der Säurebildung bei der Gärung hängen von der Intensität der Lebensprozesse der Hefe und den Pufferungsverhältnissen der Würze ab. Je nach der Gärführung und der Pufferung kann der pH-Sturz ein sehr steiler oder ein verzögerter sein. So wurde z. B. nach Emslander (248) bei einem Sud mit Digestion der pH-Sturz von 5,30 auf 4,50 in wenigen Stunden erreicht, während er bei einem Vergleichssud ohne Digestion 40 Stunden erforderte. Emslander zog daraus wichtige kolloidchemische Schlußfolgerungen in dem Sinne, daß eine allmähliche langsam zur Wirkung kommende pH-Erniedrigung mehr Kolloide (Bitterstoffe, Eiweißkörper) im Jungbier lasse als eine schroffe, womit Vollmundigkeit und Schaumhaltigkeit begünstigt werden.

Als ein Beispiel, wie sich die einzelnen Substanzgruppen, soweit sie mit der Säurebildung zusammenhängen, bei der Gärung verändern, zeigt folgende Tabelle aus einer Arbeit von Glimm und Stentzel (249).

Dauer der Gärung	0	2	5	8 Tage
Alkoholgehalt Gew.-%	—	0,96	3,43	3,48
Fuselöle Vol. ‰	—	nicht	0,1034	0,2245
		nachweisb.		

Gesamt-Säure				
als Milchsäure-%	0,0422	0,0445	0,0574	0,0935
Esterzahl g Essigester/1 L	—	0,0135	0,0348	0,0862
Amino-N mg/100 ccm	30,6	29,2	28,1	27,8

Daraus ist zu ersehen, daß die höheren Alkohole (Fuselöle) zeitlich erst mit stärker fortgeschrittener Gärung entstehen. Eine direkte Proportionalität mit der Abnahme des Aminostickstoffs ist nicht zu erkennen, denn während vom 5. bis zum 8. Gärtag dieser nur unbedeutend abnimmt, haben sich in der gleichen Zeit die Fuselöle mehr als verdoppelt. Es wäre vielleicht daran zu denken, daß die Aminosäuren in den ersten Stadien der Gärung von der Hefe aufgenommen und in einem späteren Stadium erst die aus dem Abbau derselben resultierenden Alkohole an die Würze wieder abgegeben werden. Zwischen Gesamtsäure-Ester- und Fuselölbildung besteht eine gute Parallelität, die anzuzeigen scheint, daß ihrer Bildung ein gemeinsames biologisches Prinzip zugrunde liegt.

Windisch, Reimers und Hirschbruch (250) fanden beim Studium der auf Säure-, Alkohol- und Esterbildung einflußnehmenden Faktoren, daß die Würzen, welche am meisten abgebautes Eiweiß aufwiesen, den höchsten Estergehalt erreichten, was mit Befunden von Ehrlich und Pringsheim (251) im Einklang steht. Auch H. Lüers (252) konnte an Würzen mit verschieden hohem Amino-N-Gehalt eine ähnliche Wahrnehmung machen, wie folgende Übersicht zeigt.

Malze

Zunahme bei Gärung	Kohlensäurerast	Tenne	Trommel
flüchtige Säure	350 %	85,7 %	130 %
Ester	80 %	60 %	42 %
höhere Alkohole	0,503	—	0,225
Amino N Millival in 100 ccm	2,687	1,937	1,750

Es ist daraus deutlich ersichtlich, daß der außerordentlich hohe Gehalt der Kohlensäurerastmälzerei an abgebautem Eiweiß (Amino-N) die höchsten Zunahmen an flüchtigen Säuren, Estern und höheren Alkoholen zur Folge hatte. Eine colorimetrische Prüfung der Biere auf Tyrosol und Tryptophol ergab beim Kohlensäurerastmalzbier die 2—3fache Menge als beim Tennenmalzbier.

4. Degenerierung und Regenerierung von Hefe. Anormale Gärung.

Unter der Degeneration verstehen wir eine Entartung oder aus der Art schlagen der Hefen. Wir verbinden damit normalerweise die Vorstellung, daß sich die Eigenschaften einer Hefenrasse in gärungstechnisch unerwünschter Weise verändern. Als solche Veränderungen sind festzustellen: Verlängerung der Angärzeit, träge Vergärung am Bottich mit schwacher Kräusenbildung, frühzeitiges Aufhören der Hauptgärung und damit große Differenzen zwischen Bottich- und Endvergärungsgrad, besonders starke und frühzeitige Bruchbildung. Aber auch das Gegenteil, nämlich stürmische Hauptgärung und Verlust des Bruchbildungsvermögens, auch Obergärungserscheinungen einer untergärigen Hefe können als Degenerationserscheinungen aufgefaßt werden.

Als Grund für die Degenerationserscheinungen werden nach dem übereinstimmenden Urteil einer Reihe von Autoren (Wirth 253), Belgeonne (254), Grant (255), Browns (256) eine mangelhafte Hefeernährung, die auf eine ungeeignete Würzezusammensetzung zurückzuführen ist, angesehen. Worin im Einzelnen die ungünstige Würzezusammensetzung besteht, ist noch nicht genügend geklärt. Daß aber höchstwahrscheinlich dabei gerade die Stickstoffzusammensetzung eine Rolle spielt, geht aus Beobachtungen hervor, die Ernst (257) und Lüers (258) an Gersten der ziemlich eiweißreichen Gerstenjahrgänge der Ernte 1934 anstellten. Die Eiweißlösung in der Mälzerei war verschiedentlich eine ziemlich knappe. Wurden derartige Malze nach einem extremen Hochkurzmaischverfahren gemaischt, so resultierten Würzen, die sich durch hohen Albumosen- und Peptonstickstoff- und durch niedrigen Formolstickstoffgehalt auszeichneten, wahrscheinlich aber auch hochmolekulare Kolloide anderer Stoffklassen in zu großer Menge enthielten. Die Hefen degenerierten, sie ließen in der Gärkraft nach, vergoren 12 %ige Würzen nur noch auf 5—6 % Extrakt auf dem Bottich, die Säurebildung bei der Gärung war ungenügend, das pH in den Bieren mit 4,71 abnorm hoch. Die Folgen waren eigenartige Geschmacksveränderungen in den Bieren, die sich meist erst auf den Transportfässern und Flaschen bei der Kundschaft bemerkbar machten und an den Sonnen- oder Lichtgeschmack von Bieren erinnerten. Senkung der Einmaischtemperatur um etwa 5°, Nachpeptonisierung der abläuternden Würze und Aufkräusen am Lagerfaß, beseitigten die Störungen befriedigend. Die Regenerierung einer degenerierten Hefe kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. M. Rubner (10 c. cit. 198) hat sich bereits vor langer

Zeit mit diesem Problem befaßt und folgende bemerkenswerten Gesichtspunkte entwickelt. Zwischen der Zelle mit Wachstumskraft und der Zelle mit ausschließlicher Gärkraft liegt der Zustand der Regenerationsfähigkeit unter Zunahme des Stickstoffgehaltes der Zelle. Es scheint Zellen zu geben, die wegen zu geringen Stickstoffmaterials einem Impuls des Wachstums, wie es durch Überimpfung in eine Nährlösung eintritt, nicht mehr folgen können, wohl aber dann, wenn ihnen Gelegenheit geboten wird, in einem vorbereitendem Akt den Ernährungszustand der lebenden Substanz zu verbessern. Nur durch solche Vorgänge, welche eine Sprossung zur Folge haben, durch Wachstum echter Art, kann die Zelle dauernd leben. Diese allgemeinen Gedankengänge werden beim Regenerieren degenerierter Hefe praktisch verfolgt. Am einfachsten liegt der Fall, wenn mechanische Gründe, wie Verschleimung der Zellwand durch permeabilitätsstörende Kolloide, die Degeneration herbeiführen. Dies ist z. B. der Fall durch die von Moufang Testilupin genannten Spelzeneiweiß-Hopfengerbstoffverbindungen, oder durch Feintrub verschlickte Hefe. Hier erweist sich ein Waschen mit sehr verdünnter (0,15 %iger) Kalilauge zweckmäßig. Solche gewaschene Hefe kann, vorausgesetzt, daß das Waschen mehrmals wiederholt wird, 20 bis 30 Mal geführt werden, während sie ohne Waschen schon nach 6 bis 8 Führungen entfernt werden muß. Im selben Sinne ist es auch zu erklären, daß in trubfreien Würzen die Hefen bedeutend länger geführt werden können als in trubhaltigen. Sind jedoch die Ursachen der Hefedegenerierung Ernährungsstörungen, so müssen die oben von Rubner gegebenen Gesichtspunkte beachtet werden. Man muß trachten, die Hefe durch starke Vermehrung in geeigneten Substraten zu verjüngen. Dies kann man z. B. bei stickstoffreicher, übermästeter Hefe durch eine Gärung in Rohrzuckerlösung unter Lüftung erreichen. Dadurch werden die jungen Zellen stickstoffärmer und vergären dann in der Würze wieder normal. Auch geringe Hefengabe (0,3 L/hl) und kräftiges Aufziehen sorgt für starke Vermehrung und damit für entsprechende Verjüngung der Zellen. Ist Nährstoffmangel, wie bei Dünnbieren, die Ursache für ein Nachlassen der Gärkraft der Hefe, so empfiehlt sich ein Herführen in Vorderwürze. Der Reichtum der Vorderwürze an Kohlehydraten, Stickstoffverbindungen, Mineralstoffen und Wuchsstoffen verbessert den physiologischen Zustand der Hefe derart, daß sie dann wieder in der Lage ist, anstandslos einige Führungen in der ihr weniger zusagenden dünneren Würze durchzuhalten. Auch Rubner fand bei seinen Versuchen, daß eine Fütterung mit Stickstoff der Hefe eine größere Widerstandskraft gegen die schwächende Wirkung ein-

facher Zuckernahrung verleiht. Eine einmalige Peptonfütterung hatte die schwächende Wirkung von sechs Zuckerfütterungstagen aufgehoben.

Unter den anormalen Gärungserscheinungen scheint die kochende Gärung mit den Stickstoffverhältnissen in einem gewissen Zusammenhang zu stehen. Besonders auffallend und häufig trat die kochende Gärung in den Jahrgängen 1904, 1911 und 1921 auf, die infolge Hitze und Trockenheit zu notreifen Gersten Veranlassung gaben. Feucht gelagerte oder überlöste Malze sollen nach Delbrück und Hayduck (259), gerne kochende Gärung erzeugen, weil ihr Überreichtum an leicht assimilierbarem Stickstoff geile Hefen liefert, die ungewöhnlich lebhaftes Gärtätigkeit entwickeln. Keil (260) andererseits betrachtet auch kurz gewachsene Malze in Verbindung mit Gipswässern als Veranlasser von an kochende Gärung erinnernden Erscheinungen. Harder (261) wiederum fand, daß in Bottichen, in welche besonders viel Feintrub gelangte, vereinzelt kochende Gärung auftrat. Keil hat als Abhilfe Zugabe von Hefenabsud zur gärenden Würze empfohlen, was jedoch mit Rücksicht auf den Geschmack mit Vorsicht zu geschehen hat. Auch Malzmehlzusatz wird manchmal als Abhilfe empfohlen.

5. Lagerung des Bieres.

Von den mannigfaltigen Vorgängen, welche bei der Nachgärung und Lagerung des Bieres stattfinden, interessieren im Rahmen unserer Problemstellung nur jene, welche die Stickstoffverhältnisse betreffen.

Die Kohlensäurebindung, die während der Lagerung des Bieres erreicht wird, ist in Bezug auf den Einfluß von Stickstoffverbindungen nur im allgemeinen untersucht worden. Es spielen dabei die kolloid- und dispersoidchemischen Eigenschaften hochmolekularer Substanzen, unter ihnen auch Eiweißabbauprodukte eine Rolle. Fink und Berwald (262) untersuchten die Kohlensäureentbindung im Schüttel-Gärthermostaten unter genau festgelegten Bedingungen und zwar an einem normalen Bier (I), einem solchen, zu dessen Herstellung 10 % der Schüttung an Brühmalz (II), und 25 % Brühmalz Verwendung fand (III). Aus den Versuchsprotokollen sei nur ein kurzer Auszug zur Beleuchtung der Verhältnisse gebracht.

In % der Gesamt CO_2 wurden entbunden:

	I	II	III
nach 5 Min	12,22	12,20	10,14
„ 20 „	35,59	29,66	28,48
„ 40 Min.	46,06	42,41	38,31
„ 60 „	51,66	48,51	45,07

Der Gehalt des Brühmalzes an Kolloiden günstiger Dispersität und Quellung, unter denen auch die Eiweißabbauprodukte eine Rolle spielen, hatte also das Kohlensäurebindungsvermögen nicht unerheblich verbessert.

Ein weiterer wichtiger Vorgang bei der Lagerung des Bieres ist seine möglichst vollkommene Klärung. Das Jungbier kommt mit mehr oder weniger zahlreichen Hefezellen, mit feinen Suspensionen ins Lagerfaß. Durch die Abkühlung von Gärkellertemperatur (5°) auf Lagerkellertemperatur (0—1°) treten erneut Trübungen auf, die hauptsächlich von Eiweißgerbstoffverbindungen, an welche sich jedoch noch andere Kolloide wie Bitterstoffe adsorptiv anlagern, verursacht werden. Befördert wird die Klärung durch eine normale flotte Nachgärung. Die mechanische Bewegung, welche von den Hefen und den sich bildenden Kohlensäurebläschen in der Würze verursacht wird, bringt einerseits die durch das Abkühlen instabiler gewordenen Teilchen zur Koagulation, andererseits wirkt die sich schließlich abscheidende Hefe adsorptiv, sie zieht die Suspensionen an ihre Oberfläche und führt sie mit ins Geläger. Diese Ausscheidungs- und Klärungsvorgänge sind bei träger Nachgärung ungenügend und deshalb solche Biere unedler und oft ungenügend geklärt. Zusatz von Kräusen bringt mit der verstärkten Nachgärung auch bessere Klärung und Reife des Geschmacks zustande.

In richtiger Erkenntnis, daß die Oberflächen für die Klärungsvorgänge im Lagerfaß von besonderer Bedeutung sind, hat man schon seit langem durch das Spänen zusätzliche Oberflächen in das lagernde Bier gebracht.

Das Spänen hat nur dann vollen Erfolg, wenn das Bier in kräftiger Nachgärung und Bewegung ist, weil nur auf diesem Wege die Trübungen und Hefezellen mit den spänendwirkenden Oberflächen in mechanische Berührung gebracht werden. Bei den außerordentlich großen Oberflächen der Mammuthbiospäne genügen 10—12 g pro Hektoliter für einen guten Kläreffekt.

Ein während der Lagerung des Bieres fast immer zu beobachtender geringfügiger Rückgang der aktuellen Azidität oder ein Ansteigen des pH ist einerseits darauf zurückzuführen, daß durch die Abscheidung von Geläger Kolloide von saurem Charakter wie Bitter-

stoffe, Eiweißkörper abgeschieden und außerdem von der Hefe, besonders von geschwächter und absterbender, Stoffe von höherem pH als es das Bier aufweist, abgegeben werden. Daß es sich dabei im wesentlichen um Stickstoffverbindungen handelt, hat Geys (263) durch Analyse von Jungbier, Vorhefen- und Kernhefenbier nachgewiesen, wie folgende Werte zeigen:

	Farbe	mg N in 100 ccm	pH
8%iges helles Jungbier			
nach 5 Tagen gefaßt	0,7	42,45	4,58
Vorhefebier	2,0	45,92	6,03
Kernhefebier	3,5	50,96	7,03

Da Geläger- und Hefenpreßbiere die Farbe erhöhen und ihr einen unreinen Ton verleihen, den Geschmack verschlechtern und die Neigung zu Eiweißtrübungen erhöhen, empfiehlt es sich, sie mit Adsorptionsmitteln wie Aktivkohle oder Deglutian zu behandeln. Die bereits während der Hauptgärung stattfindende Ausbildung von Aroma und Bouquet, findet ihre Fortsetzung bei der Lagerung, wo sie in einer Ausreifung und Veredelung derselben besteht. Daß dabei wiederum Stickstoffverbindungen und zwar niederen Molekulargewichtes beteiligt sind, zeigen Versuche von Glimm und Stentzel (1. c. 249), für welche als einziges Beispiel folgende an einem hellen Biere gemachten Beobachtungen dienen sollen.

Helles 12,5 %iges Bier

	Lagerzeit				
	Jungbier	2	5	7	10 Wochen
Alkohol Gew. %	3,48	3,84	3,90	3,84	3,84
Fuselöle Vol. ‰	0,2245	0,2401	0,2442	0,2587	0,2650
Ges. Säure als Milchs.					
g/100 ccm	0,0935	0,1154	0,1068	0,1024	0,0948
Esterzahl g/1	0,0862	0,0982	0,0125	0,1081	0,1095
Formol-N					
mg/100 ccm	27,8	21,1	20,5	18,8	18,2

Höhere Alkohole und Ester erfahren während der 10wöchentlichen Lagerung eine Zunahme, der formoltitrierbare Aminostickstoff eine Abnahme. Eine bisher noch nicht studierte Frage ist es, wie sich die Qualität der Proteine und ihrer Abbauprodukte und damit die Gerstenprovenienz auf das Aroma und -Bouquet eines Bieres auswirken, denn es wird nicht gleichgültig sein, ob an der Aromabildung vornehmlich z. B. Leucine (Amylalkohole) oder die aus

Tyrosin und Phenylalanin entstehenden Tyrosol oder Phenylaethanol bzw. deren Ester vorzugsweise sich beteiligen.

Auch die Reifungs- und Veredelungsprozesse, die während der Nachgärung ablaufen und sich von denen der Hauptgärung sinnfälliger unterscheiden, bedürfen noch einer gründlichen wissenschaftlichen Bearbeitung.

6. Filtration.

Die Veränderungen, welche das Bier durch das Filtrieren erleidet, sind in letzter Zeit Gegenstand von Untersuchungen gewesen, von denen vornehmlich jene J. De Clercks (264) zu nennen sind. Nach diesen wirkt sich die Adsorptionskraft des Filters besonders sinnfälliger zu Beginn des Filtrierens aus, sodaß die ersten Hektoliter oft erheblich in Zusammensetzung und Qualität verändert werden, weshalb ein Verschnitt bzw. eine gute Mischung des filtrierten Bieres ratsam erscheint. Von den analytischen Befunden ist zu erwähnen, daß vom Stickstoff am Anfang der Filtration etwa 5 % an die Filtermasse adsorbiert werden. Es handelt sich dabei wohl vornehmlich um hochmolekulares, teils in suspensoider (Trübungen), teils emulsoider Form vorliegendes Eiweiß, dessen Entfernung sich auch auf den am Anfang der Filtration beobachteten Viscositätsabfall auswirken dürfte. Einige Zahlenwerte aus unveröffentlichten Versuchen von C. Geys zeigen die Veränderung der Stickstoffverhältnisse während des Filtrierens, wobei durch Vergleich des Bieres vor und nach dem Filter der Gesamtvorgang des Filtrierens erfaßt wurde:

	dunkles Export		helles Export	
	vor	nach Filter	vor	nach Filter
Viscosität	176,5	173,4	158,2	155,4
Gesamt N	86,24	84,00	83,44	80,64
Formol N	21,0	17,5	26,25	23,63

Auffallend an diesen Zahlen ist, daß auch der Formol-Stickstoff in erheblichem Maße vom Filter herausgenommen wird. Vielleicht läßt sich diese Tatsache mit der in neuester Zeit gemachten Feststellung erklären, daß Aminosäuregemische durch Chromatographie an Filtrierpapier oder Filtermasse sich adsorbieren und differenzieren lassen, wobei allerdings die Wahl des Lösungsmittels von Bedeutung ist. Das alkoholisch-wässerige Milieu des Bieres mag möglicherweise im Sinne einer Adsorptionsbegünstigung des Aminostickstoffs wirken. Durch das Filtrieren des Bieres nimmt seine Kälteempfindlichkeit ab, wie z. B. Hartong (265), Kretschmer und Emslander (266) und ins-

besondere Richardt und Helm (267) feststellten. Maßgebend ist die Art der Filtermasse, ob alt oder neu, ob reine Zellulose oder vermischt mit Zusätzen wie Asbest, Kieselgur, die Art der Pressung und damit die Schärfe der Filtration und schließlich die Menge des filtrierten Bieres.

Nach Richardt und Helm äußert sich das Alter der Filtermasse auf die Kältetrübung folgendermaßen:

	Kältetrübung	
	alte	neue Filtermasse
0—140 hl	8	90
140—180 hl	50	170
280—420 hl	55	140

Alte Filtermasse filtriert schärfer als neue, das erst filtrierte Bier ist schärfer filtriert und daher weniger kälteempfindlich. Gewöhnliche Filtermasse und solche, die mit Asbest versetzt war, lieferten bei 3 atü Filterdruck Bier mit durchschnittlich 166 und 98 Kältetrübung, woraus die Verschärfung der Filtration durch die Asbestzugabe ersichtlich ist.

Das Filtrieren des Bieres kann sich in verschiedener Weise auf die Schaumhaltigkeit auswirken. Die meisten Autoren finden eine Abnahme derselben, was mit den Erfahrungen der Praxis übereinstimmt. Da dieser Rückgang der Schaumhaltigkeit auf die eingangs erwähnte Adsorption von Kolloiden an die Filtermasse zurückzuführen ist, wird die Schärfe der Filtration im großen Ganzen der Beeinflussung der Schaumhaltigkeit parallel gehen. Bei den bekannten Zusammenhängen zwischen Schaumhaltigkeit und Vollmundigkeit darf man den — übrigens von der Praxis erfahrungsgemäß bestätigten — Schluß ziehen, daß die Filtration, besonders je schärfer sie wirkt, auch die Vollmundigkeit des Bieres herabsetzt. Aus diesem Grunde ist es auch verständlich, warum die bei dunklen Bieren vom Münchner Typ oft nur gebräuchliche Spänung unter Verzicht des Filtrierens in Schaumhaltigkeit und Vollmundigkeit so ausgezeichnete Biere liefert. Von diesem Gesichtspunkt aus erscheint auch das in neuerer Zeit sich einführende Zentrifugieren des Bieres (siehe Lüers 267a) in neuem Lichte, da beim Separieren die Adsorption von Kolloiden an die Filtermasse in Wegfall kommt.

Wenn hier des öfteren von Kolloiden gesprochen wurde, so sind substantiell an ihnen in erheblichem Maße Proteine bzw. deren hochmolekulare Abbauprodukte beteiligt, woraus sich eben die Notwendigkeit ableitet, auf diese Verhältnisse im Hinblick auf unser Thema kurz hinweisen zu sollen.

E. Das fertige Bier

a) Eiweißtrübungen.

Unter den verschiedenen, die Qualität des Bieres beeinträchtigenden Trübungen sind im Rahmen dieser Abhandlung nur die Eiweißtrübungen von Interesse. Trotzdem sie lange bekannt sind und sich viele Forscher im Laufe der Zeit damit beschäftigt haben, konnten doch erst die Arbeiten der letzten 10—15 Jahre Klarheit in manche widersprechende Ansicht bringen.

Helm (268) teilt die Eiweißtrübungen lediglich in Kältetrübungen und Oxydationstrübungen ein, während Lüers (269) und Enders (270) eine Unterteilung in

Reine Eiweißtrübungen,

Eiweiß-Gerbstofftrübungen (Kälte-Oxydationstrübung)

und Metall-Eiweißtrübungen

vornehmen.

1. Reine Eiweißtrübung.

Was die eben genannten Autoren veranlaßte, diese Art der Trübungen als selbständige Gruppe zu betrachten, ist der Umstand, daß sie äußerlich in Form feiner Flöckchen auftreten, die sich von der Kältetrübung durch ihr nicht wieder in Lösunggehen beim Erwärmen unterscheiden. Von der Oxydationstrübung unterscheidet sie sich durch das meist plötzliche Auftreten in voller Stärke, während die Oxydationstrübung langsam über Opaleszenz, Schleirigwerden, Bodensatzbildung in Erscheinung tritt. Das plötzliche Auftreten der reinen Eiweißtrübung wurde z. B. manchmal beim Pressionsaushank vom Faßbier beobachtet, wenn der Kohlensäuredruck unvermittelt entlastet wurde. Auch Fässer, die z. B. halb entleert über Nacht unter CO₂-Pression stehen, können rasch trüb werden. Ferner sind Fälle aus der Praxis bekannt, wonach scharf durch Klärungsschichten vorfiltriertes und durch Entkeimungsschichten steril filtriertes, blitzblankes Bier sich im Verlauf eines Tages durch Ei-

weißausscheidung trübte. Wie bei den meisten Eiweißtrübungen wird es sich auch hier nicht um reines Eiweiß, sondern um kolloide Adsorptionsverbindungen oder Symplexe von Eiweiß mit anderen Kolloiden handeln. Welcher Art der die Trübung verursachende Eiweißkörper ist, ist nicht bekannt. Es kann sich wie Hartong (1. c. 196) zu beweisen glaubt, um ein denaturiertes Albumin der Gerste handeln, das nicht genügend durch Hopfenkochen und Gärung ausgeschieden wurde und in instabilem Zustand im Bier enthalten ist. Es kann sich weiterhin auch um eine der Globulinkomponenten handeln, über die kürzlich Sandegren (1 c. 4) berichtete (siehe Kühltrübung im Sudhaus).

Schließlich könnte man auch an eine Mitbeteiligung von Hefeproteinen denken, denn es ist nach Wöllmer (1. c. 243) bekannt, daß beim Verschneiden von Gelägebier mit normalem Bier schon nach Stunden oder Tagen eine äußerst fein verteilte Trübung auftreten kann, die darauf zurückzuführen ist, daß das Gelägebier mit seinem nahe an den Neutralpunkt heranreichenden pH erhebliche Mengen von Hefeproteinen enthält, die nach dem Verschneiden und Erreichen ihres isoelektrischen Punktes (pH 4,5—5) ausfallen können. Manche Fälle von in der Praxis beobachteter, besonders stark ausgeprägter Instabilität können unter Umständen auf ein ungünstiges Verschnittverhältnis mit Gelägebier zurückgeführt werden.

2. Die Kältetrübung.

Die neueren Arbeiten, welche eine sehr befriedigende und widerspruchslose Aufklärung der Kältetrübung im letzten Jahrzehnt brachten, wurden bereits anlässlich der Kühltrübung beim Kühlen der Würze citiert und referiert. Es möge genügen, hierauf zu verweisen.

Hier mögen noch einige phaenomenologische Tatsachen, die Kältetrübung betreffend kurz Erwähnung finden.

Einen auffallenden Einfluß auf die Intensität der Kältetrübung übt die Temperatur, bei der das abgefüllte Bier gelagert wird, aus. Aus den von Helm (271) mitgeteilten graphischen Darstellungen lassen sich ungefähr folgende Zahlenwerte entnehmen.

Zeit Tage	Temperatur Kältetrübung	2°		15°		30°	
		vor	nach Pasteur.	vor	nach Pasteur.	vor	nach Pasteur.
0		20	40	22	40	30	43
2		28	53	38	68	80	100
5		23	57	75	90	108	130
9		28	68	85	106	182	200

Daraus geht eindeutig hervor, daß das Bier um so mehr zur Kälte-trübung neigt, je höher die Temperatur ist, bei welcher es gelagert wurde. Schon ein einfaches Temperieren des Bieres auf 30°, wozu eine Zeit von einer halben Stunde erforderlich ist, genügt, um die Kälte-trübung von 20 auf 30 zu erhöhen. Für die Praxis ergibt sich damit die wichtige Schlußfolgerung, abgefülltes Bier nicht nur in der Brauerei, sondern auch auf dem Transport und bei den Ver-teilern möglichst kühl zu halten.

Luftsauerstoffzutritt beim Abfüllen verstärkt die Kälte-trübung, wie sowohl Helm als auch Kretschmer und Emslander feststellen. Metallspanung am Lagerfaß ergab in allen Fällen eine ungünstige Be-einflussung der Kälte-trübung. Beide Einflüsse, Sauerstoff und Met-all, beeinflussen die eine oder die andere Komponente der Kälte-trübung im Sinne einer Herabsetzung der Löslichkeit und der Ver-größerung der Dispersität, Sauerstoff, indem er den Gerbstoff ins Phlobaphen verwandelt und damit die Kälte-trübung allmählich in die Oxydationstrübung überführt, Metalle, indem sie mit der Ei-weißkomponente unlösliche Metalleiweißkomplexe bilden und die Kälte-trübung in Metalleiweißtrübung verwandeln.

Nacktmalze liefern nach Kretschmer und Emslander kältebestän-digere Biere als bespelzte Malze, was auf die Herabsetzung der Gerb-stoffkonzentration durch Wegfall des Spelzengerbstoffes zurückge-führt werden kann.

Daß Staubhefen immer kälteempfindlichere Biere liefern als Bruch-hefen, deuten Kretschmer und Emslander damit, daß der infolge höherer Vergärung durch Staubhefen bedingte höhere Alkoholgehalt ein stärkeres Lösungsvermögen für die in Decken und an der Bot-tichwand ausgeschiedenen Trubstoffe besitzt. Öfteres Abheben der Decken erhöht die Kältebeständigkeit der Biere.

Bezüglich des pH-Einflusses auf die Kälte-trübung fanden Lüers und Enders (272) eine starke Zunahme von pH 5,3 bis 4,3 und beim Über-schreiten dieses pH-Wertes wieder eine Abnahme, während Helm (273) mit fallendem pH eine dauernde Zunahme der Kälte-trübung beobachtete. Hartong, Enders und Saji (274) erklären diese Dis-krepanz durch Überlagerung einer mit abnehmenden pH ansteigen- den Dehydratation und einer Umladung der Proteinmoleküle, deren Auswirkung von Fall zu Fall verschieden ausfällt.

Sehr stark wird die Kälte-trübung durch Zusatz von Tannin zum Bier verringert, wie folgendes von Helm stammende Beispiel zeigt:

Tannin g/hl	Kältetrübung nach		
	0	15	30 Tagen
	0	350	700
	8	2	7

Behandlung des Bieres mit Adsorptionsmitteln am Lagerfaß oder beim Abfüllen z. B. mit Klärasbest, noch wirksamer mit Kieselgur, Bolus oder Deglutan vermindert erheblich oder beseitigt gänzlich die Kältetrübung, gleichzeitig auch die Oxydationstrübung (Hesselberger 275).

Während Tannin und Adsorptionsmittel den ganzen die Trübung bedingenden Komplex aus dem Bier herausnehmen, wirken proteolytische Enzyme dadurch stabilisierend, daß sie hochmolekulare Eiweißstoffe in niedriger molekulare Spaltstücke abbauen, welche nicht mehr trübungsbildend sind. Als Proteinasen finden gewöhnlich Papain mit einem dem Bier entsprechenden pH-Optimum von 4—5 und Pepsin mit einem pH-Optimum von 1,5—2 Verwendung. Trotz dieses weit vom pH des Bieres entfernt liegenden Optimums erzielt man mit dem Pepsin sehr kräftige Wirkungen, die wahrscheinlich auf Enzymkomponenten im Pepsin, z. B. vom Typ des Kathepsins zurückzuführen sind, deren pH Optimum bei 4 bis 5 liegt. Ein bekanntes Enzympräparat zur Beseitigung der Kältetrübung (Chillproof) ist das Collupulin der Wallerstein Co. New York. Die Wirkung dieser Enzyme geht aus folgender Tabelle (Helm) hervor.

Pilsner Bier 10,7% pasteurisiert.

Enzymzusatz abgefüllt		Kältetrübung abgekühlt			u. Stehen bei 20°
g/hl	unter	0	4	12	30 Tage
0	Luft	175	285	450	—
	CO ₂	175	225	450	—
0,2	Luft	40	10	16	14
	CO ₂	30	10	5	3
0,06	Luft	50	85	150	—
	CO ₂	30	75	95	—
0,10	Luft	0	0	5	25
	CO ₂	0	2	5	18
0,2	Luft	0	0	7	20
	CO ₂	2	0	5	10

Die Tabelle läßt erkennen, daß sowohl Pepsin wie Papain die Kälteempfindlichkeit des Bieres außerordentlich herabsetzen. Gleichzeitig mit der Verminderung der Kältetrübung geht eine analytisch feststellbare Verringerung des tanninfällbaren und in geringem

Maße auch des koagulierbaren Stickstoffs einher. Da das Papain sauerstoffempfindlich ist, ist seine Wirkung in den mit Kohlensäure abgefüllten Bieren etwas stärker. Die Schaumhaltigkeit wird durch die Wirkung der Proteinasen nur wenig verringert und zwar durch Pepsin etwas stärker als durch Papain. Schütteln verstärkt die Kälte-trübung ziemlich beträchtlich.

Zuletzt sei noch darauf hingewiesen, daß nach den Untersuchungen von Kolbach und Wilharm (275a) die Kälte-trübung und Kälte-empfindlichkeit der Biere mit fallender Stammwürzekonzentration rasch abnimmt, wie folgende Übersicht zeigt. Die Hopfengabe war mit 200 g/hl in allen Fällen die gleiche.

Stammwürzegehalt %	12	6	3
Bier nach Hauptgärung			
Kälte-trübung nach 2 Stunden bei 0°	490	250	120
Bier nach Lagerung			
Kälte-trübung nach 48 Stunden bei 0°	150	50	10

3. Die Oxydationstrübung.

Die Oxydationstrübung unterscheidet sich von der Kälte-trübung dadurch sehr charakteristisch, daß sie durch Erwärmen des Bieres nicht mehr wieder zum Verschwinden gebracht werden kann. Auch wird ihr Auftreten normalerweise erst nach Verlauf längerer Zeit beobachtet. Man hat diese Trübung früher auch als „echte Protein-trübung“ benannt, und wollte damit wohl zum Ausdruck bringen, daß sie von hochmolekularen, genuinen Eiweißstoffen hervorgerufen wird, wofür aber exakte Beweise mangeln. Eine viel gebrauchte Bezeichnung dafür ist auch die der Pasteurisierrübung, die besagen sollte, daß sie als Folge des Pasteurisierens auftritt. Auch dies ist nicht richtig, da Biere, welche nicht pasteurisiert wurden, ebenfalls diese Trübung aufweisen, wenngleich nicht zu verkennen ist, daß die mit dem Pasteurisieren verbundenen Alterationen des Bieres das Auftreten dieser Trübungsart befördern können. Um Verwirrungen zu vermeiden, soll deshalb der von Helm gemachte Vorschlag angenommen werden, wonach künftig diese nun zu behandelnde Trübungsart als Oxydationstrübung bezeichnet werden soll.

Die Begründung für diese Bezeichnung liegt darin, daß eine durch den Luftsauerstoff des Bieres verursachte Oxydation der für das Auftreten der Trübung wesentlich verantwortliche Faktor ist. Modellversuche von Enders an Proteingerbstoffsystemen zeigten, daß die Trübung beim Durchleiten von Sauerstoff jeweils bedeutend stärker in Erscheinung trat, als beim Durchleiten von Stickstoff. Reine

Eiweißlösungen zeigen kein derartiges Verhalten, sodaß die Verstärkung der Trübung auf Konto des Gerbstoffes zu schreiben ist. Die Gerbstoffe gehen unter dem Einfluß des Sauerstoffes in Phlobaphene über, wodurch sich ihre eiweißfällende Wirkung erhöht.

Auch diese Trübung besteht niemals aus reinem Eiweiß, sondern aus einem Symplex organischer und anorganischer Kolloide. Lüers und Landauer (276) isolierten aus 1 hl pasteurisiertem Bier etwa 1 g Trübungssubstanz mit 40,8 % Protein und 11 % Asche. Gerbstoff ließ sich nachweisen.

Wie Helm (1. c 273) mitteilt, erhielten Jessen-Hansen und Vimpel aus einer großen Zahl von im Schaukelschrank geschüttelten pasteurisierten Bieren durchschnittlich 1,3 g Trübungssubstanz pro hl, mit einem mittleren Eiweißgehalt von 54 %. Unter den Aschenbestandteilen fällt der hohe Gehalt an Kieselsäure auf, die infolge ihrer kolloiden Eigenschaften und ihrer negativen elektrischen Ladung zur Symplexbildung mit dem Eiweiß-Gerbstoffkomplex besonders geeignet erscheint.

Die heutige Ansicht über das Zustandekommen der Oxydationstrübung ist die, daß die aus Eiweißgerbstoffsymplexen bestehende Kältetrübung durch Oxydation der Gerbstoffkomponente zum Phlobaphen in die Eiweiß-Phlobaphenverbindung übergeht, womit sich die Eigenschaften der Kältetrübung ändern, insoferne die Wiederlöslichkeit der Kältetrübung beim Erwärmen verloren geht und die Oxydationstrübung irreversibel unlöslich ist. Wir sind aber mit Helm der Ansicht, daß eine völlige Identität beider Trübungen nicht besteht, weil Kältetrübung und Oxydationstrübung nicht in gleicher Weise durch die Proteinase Papain und Pepsin beeinflußt werden (siehe später).

Die Messung der Oxydationstrübung erfolgt auf nephelometrischem Wege, indem die Bierproben längere Zeit einer schüttelnden Bewegung ausgesetzt werden, wofür nach Helm (1. c 268) Schüttelschränke mit waagerechter Bewegung oder solche mit senkrechter (Springschrank) Verwendung finden. Beispiel:

Oxydationstrübung gemessen nach				
	5	10	20	40 Tagen
nicht geschüttelt	—	0	0	35
Schaukelschrank	—	4	12	41
Springschrank	1	7	16	63

Von besonderem Einfluß auf die Größe der Oxydationstrübung ist die Art der Abfüllung, nämlich unter Gegenwart oder Ausschluß

von Luft. Nachdem man heute weiß, daß die Oxydationstrübung, wie ihr Name sagt, auf eine Oxydation der Gerbstoffkomponente zurückzuführen ist, muß der Zutritt von Luftsauerstoff zum Bier beim Abfüllen trübungsverstärkend, sein Ausschluß trübungsvermindernd wirken. Dafür sind eine große Anzahl von unwiderleglichen Beweisen erbracht worden; es mag genügen, auf die schon öfters zitierten Arbeiten von Helm hinzuweisen. Praktisch haben diese Beobachtungen ihre Nutzenanwendung in der luftfreien Abfüllung des Bieres (Kohlensäurevorfüllung, Aufschäumen im Flaschenhals) gefunden. Tanninzusatz setzt die Oxydationstrübung (ebenso die Kältetrübung) sehr erheblich herab, z. B. von 233 ohne Tannin auf 51 mit 8 g Tannin je hl (Helm).

Mechanische Adsorptionsmittel, z. B. Deglutan (Protexverfahren) oder Kieselgur, Bolus u. a. (Hesselberger 275) entfernen auf einem das Reinheitsgebot nicht verletzenden Wege die Oxydationstrübung in befriedigender Weise.

Schweflige Säure und deren Salze wirken auf chemischem Wege durch Unschädlichmachung des Sauerstoffs trübungsverhindernd, oder mindestens trübungsverringend.

Wie aus den von Sandegren (l. c. 4) referierten Arbeiten der schwedischen Forscher hervorgeht, ist die Kältetrübung befähigt, Sauerstoff aufzunehmen und zwar in einem zeitlichen Vorgang, der nach einer anfänglichen Induktionsperiode allmählich zu stark zunehmender Intensität führt. Anlässlich der Kühltrübung wurde hierauf bereits hingewiesen. Da in der Kältetrübung des Bieres Schwermetalle wie Kupfer und Eisen gefunden wurden, ist der Schluß nicht von der Hand zu weisen, daß diese Metalle auf die Sauerstoffaufnahme der Kältetrübung einen katalytischen Einfluß ausüben.

Die vorhin eben erwähnte Wirkung der schwefligen Säure bzw. ihrer Salze beruht auf der Herabsetzung des Redoxpotentials des Bieres; in ähnlichem Sinne wirkt sich das Abfüllen unter Ausschluß des Luftsauerstoffes auf das pH des Bieres aus.

Pepsin setzt bereits in einer verhältnismäßig geringen Menge (0,2 g/hl) die Oxydationstrübung herab, während die gleiche Menge Papain, die auf die Kältetrübung sehr stark erniedrigend wirkte, die Oxydationstrübung eher noch verstärkte. Erst die in der Praxis üblichen Mengen von 0,5 bis 1 g/hl Papain wirken nach allgemeinen Erfahrungen günstig auf diese Trübungsart ein.

Schutzkolloide, wie hoher Dextrin- und Melanoidingehalt wirkt sich trübungsverringend aus, doch läßt sich damit die Trübung nicht in einem technisch für Exportbiere brauchbarem Ausmaß bekämpfen.

Die technischen Maßnahmen, welche zur Verhinderung der Oxydationstrübung einzuschlagen sind, wurden von verschiedenen Seiten öfters diskutiert. Ältere Veröffentlichungen stammen von Visez (277) u. F. Emslander (278), neuere von Dietsche (279), um nur die wichtigsten für interessierte Leser zu nennen. Ferner ist hier auch auf die umfangreiche Literatur über das Redoxpotential und viele Publikationen über die Rolle des Sauerstoffes beim Abfüllen zu verweisen, die einzeln hier aufzuführen nicht der Platz ist.

4. Die Metalleiweißtrübung

Diese Art von Eiweißtrübung kommt dadurch zustande, daß Schwermetallionen, welche infolge Berührung des Bieres mit blanken Metalloberflächen in Lösung gehen, mit Eiweißkörpern irreversibel unlösliche Verbindungen eingehen. Die Trübungen treten hin und wieder als Schleier, manchmal auch als flockige Niederschläge auf, die sich von der Kältetrübung durch ihre Unlöslichkeit beim Erwärmen deutlich unterscheiden.

Bereits lange Zeit zurückliegende Versuche von Siebel (280) zeigten, daß nach Dialyse des Bieres nur die im Dialysator zurückbleibende Fraktion die Metalleiweißtrübung lieferte, woraus er schloß, daß nur hochmolekulares Eiweiß zur Bildung der Trübung befähigt ist.

Bekannt ist, daß sowohl äußerst geringe, als auch große Mengen von Schwermetallen Eiweiß zu fällen vermögen, während dazwischen eine Zone der Wiederauflösung des Niederschlages liegen kann. Für die Praxis der Brauerei spielen nur die durch sehr geringe Metallmengen hervorgerufenen Fällungen eine Rolle. Als trübungserzeugende Metalle kommen in erster Linie Zinn, Eisen und Kupfer in Betracht.

Am meisten hat man sich mit der Zinntrübung des Bieres beschäftigt und festgestellt, daß die unter 18° C vorliegende amorphe Modifikation des Zinnes, die auch zur Zinnpest Veranlassung gibt, anscheinend auch leicht angreifbar ist und damit leicht trübungsversachend wirkt. Die Neigung zur Trübung wird auch durch hohe Azidität, sowie durch große Oberflächen u. B. Verzinnung statt massives Zinn, durch vagabundierende Ströme begünstigt. Schutzkolloide wie Dextrine und Melanoidine (dunkles Bier) und Schutzüberzüge aus Bierstein wirken trübungsverringend.

Chabot, Delie und Gaeremyne (281) beobachteten vor kurzem, daß bei der Berührung von Bier mit Zinn bereits nach 4 Stunden eine

Erhöhung der Oberflächenspannung eintritt, die nach 24 Stunden sich nicht mehr verstärkte. Erst nach 24 Stunden wurde das Bier trüb. Daraus ist zu schließen, daß das Zinn mit oberflächenaktiven Stoffen reagiert, was schon zu einer Zeit, wo das Bier noch frei von Trübung ist, messend verfolgt werden kann. Die löslichen Bestandteile des Hopfens geben mit Zinn keine Trübung, Peptone und ähnliche Eiweißabbauprodukte liefern nur schwache Trübungen, während unter den hochmolekularen Proteinen sich besonders Edestin und Glutelin als instabil gegen Zinn erweisen. Edestin und Glutelin kommen jedoch als solche im Bier nicht mehr vor, jedoch hochmolekulare Abbauprodukte derselben. Aber nicht nur die Eiweißkörper als solche, sondern auch Eiweiß-Gerbstoffverbindungen vermögen mit Zinn zu reagieren, wie vor kurzem Helm (10 c. cit. 273) in ausführlichen, instruktiven Studien über die Metalltrübungen nachweisen konnte und damit experimentell den Beweis über den vermuteten Zusammenhang von Proteintrübungen mit Metalleiweißtrübungen erbrachte. Zur Erläuterung der Verhältnisse sei folgender Auszug aus den Ergebnissen von Helm gebracht.

Einfluß von Zinn auf Bier.

mg Zinn ++/L	abgefüllt unter	Kältetrübung nach Stehen bei 12° in Tagen	Bleibende Trübung nach Schütteln bei 20° in Tagen					
			0	30	10	20	40	60
0	} Luft	263	615	2	7	41	83	
1,0		273	0	778	925	1000	756	
0	} CO ₂	152	575	0	0	5	10	
1,0		250	50	600	738	825	594	

Daraus ist zu ersehen, daß die sofort nach dem Pasteurisieren meßbare Kältetrübung durch Zinn nur wenig beeinflusst wird. Nach 30 Tagen dagegen hatte das Zinn eine deutliche Abnahme der Kältetrübung bewirkt. Die bleibende Trübung nimmt im Laufe der Zeit stark zu und zwar auf Kosten der Kältetrübung. Die Trübung kann im Laufe der Zeit unter Agglutination zur Flockung führen, worauf die Abnahme der Trübungsstärke zwischen 40. und 60. Tag in obiger Tabelle zurückgeführt werden kann. Die Schaumhaltigkeit wird durch Zinn nicht beeinflusst.

Auch Eisen kann Trübungen hervorrufen, doch sind dazu bedeutend größere Mengen als von Zinn erforderlich. So wurde z. B. von Dehnike (282) und Fries (283) beobachtet, daß Eiseneiweißtrübungen mehrfach in der Praxis durch eisenhaltiges Zuckerkuleur hervor-

gerufen wurden. Auch nicht genügend isolierte eiserne Spundbüchsen können gelegentlich Trübungen verursachen. Der Einfluß des Eisens auf die Eiweißtrübungen des Bieres geht aus folgender auszugsweise gebrachten Tabelle von Helm (10 c. cit. 273) hervor:

Einfluß von Eisen auf Bier.

mg Eisen 1	abgefüllt unter	Kältetrübung nach		Bleibende Trübung nach			
		Stehen bei 12° in Tagen		Schütteln bei 20° in Tagen			
		0	30	10	20	40	60
0	Luft	285	750	9	29	92	162
1,9 Fe ++		265	750	49	130	256	300
1,9 Fe +++		300	750	41	105	216	300
0	CO ₂	310	700	10	22	51	104
1,9 Fe ++		275	600	46	54	94	122
1,9 Fe +++		265	625	29	40	60	88

Die Kältetrübung wird durch Eisen in einer Menge von 1 bis 2 mg/L fast nicht beeinflußt. Andererseits bewirkt Eisen eine deutliche Vermehrung der bleibenden Trübung, besonders wenn das Bier in Gegenwart von Sauerstoff abgefüllt wird. Ob das Eisen in der Ferro- oder Ferriform vorliegt, scheint gleichgültig zu sein. Während Matthews (284) bei Überschreiten von 3,5 mg Eisen im Liter das Auftreten eines deutlichen Metallgeschmackes feststellt, ist nach Helm ein solcher bereits bei 1 mg Fe/L bemerkbar, was auch unseren Erfahrungen entspricht. In normalen Bieren erreicht der Eisengehalt höchstens 0,5 mg/L, meist bleibt er erheblich darunter. Der Schaum eisenhaltigen Bieres wird haltbarer, allerdings auch speckiger, oft zeigen sich beim Zusammenfallen gelblich gefärbte, kompakte Schauminseln.

Trotzdem Kupfer für viele Geräte als Werkstoff dient und dieses Metall ziemlich stark dem Angriff unterliegt, findet man durch Kupfer verursachte Eiweißtrübung sehr selten. Das Metall wird zum größten Teil von Trub, Hefe und Geläger aufgenommen. Das fertige Bier enthält nach der Filtration etwa 0,3 mg Cu im Liter. Bis zu 1 mg Kupfer/L wird man nicht von irgend welchen nachteiligen Wirkungen sprechen können. Bei Versuchen von Helm (l. c. 273) hatten 0,2 mg Cu/L keinen Einfluß auf die Kältetrübung, 2 mg dagegen zeigten eine deutliche Trübung. Ähnliches ist der Fall für die bleibende Trübung und zwar scheint das Kupfer auch unter Kohlensäureabfüllung sehr aktiv zu sein. Trübungsaktiv sind nach verschiedenen Feststellungen die einwertigen Cupro-Jonen, nicht oder wesentlich weniger die 2-wertigen Cupri-Jonen. Denn Bier mit

10 mg Cu^{II} /L, das nur sehr geringe Trübung zeigte, wurde in der Trübung wesentlich verstärkt, als trübungsindifferentes Sulfit als Reduktionsmittel zugesetzt wurde.

Unter vergleichbaren Bedingungen steigt die Trübungsaktivität in der Reihenfolge an: Kupfer, Eisen, Nickel, Zinn. (Gray und Stone 285.) Bei Nickel und Zinn dürfte die unmittelbare Reaktion mit den Eiweißkörpern im Vordergrund stehen, während bei Kupfer und Eisen ihr, die Sauerstoffadsorption katalysierender Einfluß von Bedeutung ist.

b) Schaumhaltigkeit; Vollmundigkeit.

Phänomen und Begriff der Schaumhaltigkeit sind ebenso kompliziert wie vielgestaltig. Zahlreich sind die Forscher, welche über dieses unter den Getränken das Bier in hervorragendem Maße auszeichnende Gebiet gearbeitet und veröffentlicht haben. Es ließ sich über das Problem „Schaumhaltigkeit“ ein eigenes Buch schreiben. Wenn wir hier dazu Stellung nehmen, so kann es wieder nur unter dem Gesichtspunkt des Stickstoffs sein und wir sind uns darüber bewußt, daß wir der Darstellung des Problems einen Zwang antun müssen, wenn wir es nur unter dem Aspekt der Stickstoffverbindungen betrachten.

Das Gesamtproblem hat der Verfasser an anderer Stelle ausführlich behandelt, auch darf auf eine zusammenfassende Abhandlung von Hartong (286) aus neuester Zeit verwiesen werden.

Bei den Schäumen als kolloiden Systemen, welche sich aus den beiden Phasen gasförmig-flüssig aufbauen, spielen in erster Linie die an Oberflächen sich abspielenden Erscheinungen eine Rolle. Hierzu gehört einerseits die aus dem Gibbs-Thompsonschen Theorien abgeleitete Tatsache, daß oberflächenaktive Stoffe, also solche, welche die Oberflächenspannung erniedrigen, in die Grenzflächen gehen und sich dort anreichern, ferner die hauptsächlich von Langmuir-Harkins studierte Erscheinung, daß die Moleküle einer in die Oberfläche gehenden Substanz sich so orientieren, daß die polaren, hydrophilen Gruppen in die Flüssigkeitsschicht eintauchen, während die hydrophoben Gruppen aus der Oberfläche in den Gasraum hineinragen. Dadurch kommt das Spreiten von Molekülen in Oberflächenfilmen zustande, wie wir es besonders bei Eiweißkörpern vertreten finden (siehe I. Teil). Schließlich kommt als letzter wesentlicher Faktor die besonders von Ramsden und Metcalf studierte Häutchen- oder Netzbildung durch in die Oberflächen gehenden Kolloide hinzu. Die Prinzipien, welche vor allem zur Häutchen-

bildung Anlaß geben, werden von Wo. Ostwald und Meißner (287) folgendermaßen umrissen:

1. Adsorption eines oberflächenaktiven Kolloides an die Grenzfläche nach Gibbs durch Oberflächenentspannung.
2. Chemische Reaktion nach Metcalf. Metcalf folgerte: Wenn Stoffe einer Lösung befähigt sind, eine chemische Umsetzung zu bewirken, welche die Oberflächenspannung erniedrigt, so liegt die Neigung zum Statthaben dieser Reaktion vor.
3. Chemische Reaktion in der Grenzfläche unter Bildung eines Niederschlages, z. B. Oxydation.
4. Verdampfung eventuell mit anschließender Polymerisation und Änderung der Oberflächenspannung. Hierher gehört unseres Erachtens auch die Stabilitätsänderung eines labilen Systems durch eintretende Konzentrationserhöhung infolge Anreicherung in der Grenzfläche.
5. Spezifische mechanische Packung von Teilchen als Folge ihrer Orientierung nach Langmuir-Harkins, eventuell verstärkt durch grobdisperse Teilchen (armierte Häutchen oder Flotationshäutchen).

Unter den Kolloiden des Bieres kommt ohne Zweifel den Eiweißkörpern und ihren Abbauprodukten die Bedeutung zu, an der Schaumhaltigkeit maßgebend beteiligt zu sein, denn sie sind zu einem gewissen Betrag oberflächenaktiv, besitzen das Vermögen der Orientierung durch Spreitung auf Oberflächen und vermögen in ausgesprochenem Maße Häutchen oder Netzwerke auf den Gasblasenoberflächen zu bilden. Eine Frage, die schon oft aufgeworfen wurde, ist die, welcher Dispersitätsgrad der Stickstoffverbindungen für die Schaumhaltigkeit günstig sei. Daß niedermolekulare Abbauprodukte, also der formoltitrierbare Stickstoff, ausscheiden, bedarf keiner Diskussion. Dagegen sind die Verhältnisse hinsichtlich Albumosen- und Peptonen und hochmolekularen echten Proteinen noch nicht geklärt. Neuere Untersuchungen des schwedischen Forscherkreises (Sandegren l. c 4) haben nun hier eine gewisse Entscheidung gebracht. Bei ihren Versuchen wurde, wie bei der Kühl- und Kälte-trübung referiert, Bier durch Zentrifugieren im Großbetrieb von der Kälte-trübung, also einer hochmolekularen Eiweißgerbstoffverbindung, deren Eiweißkomponente ein Molekulargewicht von ca. 30 000 besaß, befreit. Ein Vergleich des ursprünglichen und des von der Eiweiß-trübung befreiten Bieres auf Schaumhaltigkeit ergab keine Unterschiede in derselben, sodaß hochmolekulares Eiweiß, wenigstens vom Typ der Kälte-trübung für die Schaumhaltigkeit ohne Bedeutung ist.

Die genannten Autoren isolierten daraufhin nach Art der von Gray und Stone (1. c. 285) eingeführten Zerstäubungsfractionierung die im Schaum sich anreichernden und nach Zerfallen des Schaumes in Lösung befindlichen Eiweißkörper. Durch Ammonsulfat wurden die hochmolekularen Proteine gefällt, die Fällung in Kochsalzpufferlösung von pH 7 gelöst und salzfrei dialysiert. Dabei entstand kein Niederschlag, somit hatte das Protein keinen Globulincharakter. Bei Ultrazentrifugenversuchen ergab sich die Sedimentationskonstante 1,0, was ein Molekulargewicht von etwa 10 000 anzeigt. Es liegen also ziemlich hochmolekulare Stickstoffverbindungen vom Typ der Albumosen vor. Ihre Lösung zeigte eine hohe Oberflächenaktivität. Durch diese Versuche ist ohne Zweifel eine wichtige Erkenntnis über die Natur der Schaumbildner, soweit es die Stickstoffgruppe anbelangt, gewonnen, jedoch spielt, wie viele Beobachtungen zeigen, neben der Wesensart der Stickstoffverbindungen auch ihr kolloider Zustand, d. h. ihr Dispersitätsgrad und Quellungszustand eine erhebliche Rolle. Dafür mögen einige Beispiele folgen.

Lüers und Moninger (288) suchten in umfangreichen Studien über die schaumbeeinflussenden Faktoren, den komplizierten beim Bier-schaum gegebenen Verhältnissen dadurch näher zu kommen, daß sie ihre Beobachtungen an einfachen, leicht überblickbaren und reproduzierbaren Modellversuchen anstellten. Als Grundsystem wählten sie 0,1%ige Gelatinelösung, der 0,1 % Amylalkohol zugesetzt war. Gelatine allein liefert zwar einen guten Schaum, der jedoch nicht besonders haltbar ist. Amylalkohol als stark oberflächenaktive Substanz in der angegebenen Konzentration zwar auch, aber der Schaum fällt in wenigen Sekunden zusammen. Das Gemisch aus Gelatine und Amylalkohol dagegen liefert einen idealen, rahmigen und gut haltbaren Schaum.

Setzt man diesem System nun z. B. nur 0,1 Millimol Ferrichlorid zu, so tritt eine weitere erhebliche Verbesserung der Schaumhaltigkeit ein, wie als eines für viele Beispiele folgende Zahlenwerte der Schaumbeständigkeit, gemessen im Apparat von Luer-Wieninger, demonstrieren:

System 0,1%ige Gelatine + 0,1%igen Amylalkohol.

Schaumvolumen in ccm nach

	0	10"	30"	60"	2'	5'	10'
Ohne Zusatz	85,5	76,8	65,8	58,0	55,2	50,0	48,7
+ 0,1 M.Mol Fe Cl ₃	85,0	79,2	74,4	72,0	68,5	67,0	66,5

Die geringe Menge von 0,1 Millimol Eisen hat also eine sehr beträchtliche Steigerung der Schaumhaltigkeit zur Folge. Blom (289) untersuchte die Wirkung von Eisen und anderen Metallsalzen auf das natürliche System des Bierschaumes und fand für die Wirkung der Ionen Zn^{++} : Cu^{++} : Fe^{+++} : Fe^{++} die Verhältnisswerte 1:2:10:20. Bindet man Fe^{+++} und Fe^{++} komplex an Seignettesalz, so ist das dreiwertige Eisen weit wirksamer als das zweiwertige.

Die Wirkung sehr geringer Mengen von Schwermetallsalzen auf den Bierschaum läßt sich auf ihre bekannten, eiweißfällenden Eigenschaften und damit auf Veränderungen des Dispersitätsgrades der Eiweißkolloide zurückführen. Für diese Tatsache erbrachte schon vor langer Zeit Mohr (290) einen schönen Beweis dadurch, daß er die nicht gute Schaumhaltigkeit einer klar filtrierten Albumosenlösung durch Zugabe von etwas Zinksulfat wesentlich verbessern konnte. $Zn-SO_4$ wirkt auf Albumosen fällend und in geringer Menge dispersitätsgradvergrößernd.

Lüers und Moninger fanden die gleiche Erscheinung am Modell Gelatine-iso Amylalkohol nach Zusatz von Tanninlösung. Bereits eine Tanninkonzentration von 0,00001 % rief schon eine deutliche Zunahme der Schaumhaltigkeit hervor, die bei 0,001 % ihr Maximum erreichte. Sobald die Lösung durch den Tanninzusatz opaleszent oder milchig getrübt erscheint, beobachtet man die Zunahme der Schaumhaltigkeit, treten dagegen Flöckchen auf, ein Zeichen für eine starke Abnahme des Dispersitätsgrades, dann fällt die Schaumhaltigkeit rasch wieder ab.

Die bisher gebrachten Beispiele sollen zum Beweis für die Tatsache dienen, daß der Dispersitätsgrad der Kolloide und zwar in erster Linie hochmolekularer Eiweißkörper für die Stabilität von großer Bedeutung ist und zwar weisen die gemachten Beobachtungen darauf hin, daß weder eine zu weitgehende (molekulare), noch zu grobe (suspensioide), sondern eine mittlere (kolloide) Dispersität die optimalen Bedingungen schafft.

Eine andere Forschungsrichtung zielt darauf ab, die Substanzen, welche als Träger für die Schaumhaltigkeit in Betracht kommen.

zu erfassen. Weiter oben wurde bereits auf die neuesten Ergebnisse nach dieser Richtung, gewonnen von dem schwedischen Forscherkreis, hingewiesen. Das Prinzip ist das, durch eine geeignete Methode Schaum zu erzeugen, diesen zusammenfallen zu lassen und nun im Schaumbier und im ursprünglichen Bier analytische oder präparative Untersuchungen anzustellen. Lüers, Geys und Baumann (291) arbeiteten schon vor langem nach dieser Methode und erhielten, was den Stickstoff anbelangt, auszugsweise folgende Ergebnisse:

	Stickstoff		Formol N-		Oberflächenspannung	
	g im Extr.		Millival im Extr.		Dyn/cm	
	Bier	Schaum	Bier	Schaum	Bier	Schaum
Kriegsbier						
4,5 %ig						
dunkel	0,990	1,124	13,15	7,29	54,3	49,9
Vollbier						
10,8 %ig.						
dunkel	1,039	1,517	24,75	20,09	51,3	43,7
Vollbier						
10,5 %ig						
hell	1,175	1,685	34,96	21,71	50,4	48,2

Aus diesen Zahlenwerten ist vor allem die Bestätigung zu entnehmen, daß, wie es die Theorie erfordert, oberflächenaktive Verbindungen sich im Schaum anreichern müssen. Dementsprechend finden wir die Oberflächenspannung der Schaumbiere durchwegs zum Teil erheblich niedriger als die der Originalbiere. Der Gesamtstickstoff im Extrakt findet in den Schaumbieren durchgehend eine geringe Anreicherung, der niedrigmolekulare Formolstickstoff eine Abnahme, sodaß die Zunahme des Gesamt-N auf Kosten hochmolekularen N erfolgen muß.

Auch Mischke (292), ferner Krauss und Harreis (293) konnten auf dem Wege der Zerschäumungsanalyse eine Anreicherung hochmolekularer Stickstoffverbindungen im Schaum nachweisen. Während nach den Untersuchungen des ersteren hauptsächlich die nach der Lundin'schen Fraktionierungsmethode als Albumosen bezeichnete Fraktion in den Schaum geht, fanden die letzteren im Schaum vorzugsweise eine Anreicherung der mit Tannin fällbaren N-Verbindungen. Krauss und Harreis untersuchten weiterhin mit Hilfe einer Torsionsapparatur die im Bier vorkommenden Kolloide auf ihre

Fähigkeit zur Häutchen- bzw. Netzwerkbildung. Eine solche konnte nicht beobachtet werden an Maltose, Gummiarabicum, Pektin, Dextrin und Hopfenabsuden. Dagegen zeigte sie sich in ausgesprochenem Maße bei den aus Bier (gehopft und ungehopft) durch Zerschäumung gewonnenen Eiweißstoffen. Selbst bei starker Verdünnung ergibt sich eine starke Dämpfung eines an der Flüssigkeitsoberfläche in Schwingung versetzten Glasplättchens, was auf das Eintreten von Häutchenbildung zurückzuführen ist. Folgend ein Beispiel:

	Dämpfungsfaktor nach		
	2	4	8 Min.
Ursprüngliche Lösung	1,07	1,07	1,07
5fach verdünnt	1,075	1,092	1,13
25fach verdünnt	1,085	1,10	1,125

Gray und Stone (294) führten ebenfalls Zerschäumungsanalysen an Bier durch und fanden für Protein und Bitterstoffe auszugsweise folgende Analysenwerte:

	Originalbier	Schaumbier	Restbier
Volumen ccm	7 500	1 175	6 325
Protein %	0,399	0,513	0,375
% Zunahme gegen Orig.		28	
Bitterstoffe %	0,017	0,048	0,010
% Zunahme gegen Orig.		185	

Von den 3 Fraktionen wurde dann nach Blom die Schaumhaltigkeit gemessen und als Schäumigkeit Σ ausgedrückt. Gleichzeitig wurde die Schaumdichte, das ist der Prozentgehalt des Biervolumens, im Schaumvolumen bei steigender Verdünnung ermittelt. Original-Schaum- und Restbier hatten die bezüglichen Schäumigkeitswerte Σ 110, 163 und 83, woraus deutlich hervorgeht, daß sich die Schaumträger im Schaumbier angereichert haben, während das Restbier daran verarmt ist. Interessant ist das Verhalten der Schaumdichte. Das Restbier zeichnet sich durch eine sehr geringe Schaumdichte aus, die etwa der des 10fach verdünnten Originalbieres gleichkommt. Originalbier und Schaumbier haben die gleiche Schaumdichte, unterscheiden sich aber dadurch sehr erheblich von einander, daß bereits eine mäßige Verdünnung (1:2) des Originalbieres genügt, um seine Schaumdichte deutlich herabzusetzen, während beim Schaumbier

erst eine 20fache Verdünnung eine nur unbedeutende Herabsetzung der Schaumdichte hervorruft. Der Schaumbildungskomplex ist also im Schaumbier stark angereichert und spielt hier eine ähnliche Rolle wie die Puffersubstanzen und das pH bei der Verdünnung.

Betrachtet man die Eiweißkörper und die Hopfenharze als die wesentlichen Bestandteile des Schaumkomplexes, so hat an diesen im Schaumbier eine Anreicherung von 0,138 % Protein und 0,038 % Hopfenharzen stattgefunden. In Verbindung mit den Schaumdichtebestimmungen in Abhängigkeit von der Konzentration ergeben sich dann folgende Protein: Bitterstoffrelationen in den einzelnen Verdünnungen:

	Schaumsubstanzen		Schaumdichte
	Protein	Bitterstoff	
Unverdünnt	0,138	0,038	22,8
verdünnt 1 + 2	0,046	0,0127	22,1
„ 1 + 4	0,028	0,0076	22,3
„ 1 + 4	0,014	0,0038	21,2
„ 1 + 19	0,007	0,0019	20,0
„ 1 + 29	0,005	0,0013	13,3
„ 1 + 49	0,003	0,0008	6,3

Bei einer 20fachen Verdünnung, bei der die Schaumdichte praktisch noch unverändert war, betrug der Proteingehalt 0,007 %, der Bitterstoffgehalt 0,0019 %. Da bei weiterer Verdünnung die Schaumdichte bereits stark abfiel, stellen die genannten Protein- und Bitterstoffkonzentrationen anscheinend die Minimumkonzentration an Schaumsubstanzen dar, die noch zur Bildung eines gesättigten Schaumes befähigt sind.

Diese Versuche von Gray und Stone haben u. E. auch ein helles Licht auf die Bedeutung der Kolloidsysteme für die Schaumhaltigkeit geworfen. Hier an dem gebrachten Beispiel zeigte sich der außerordentlich wichtige Einfluß der Zusammenwirkung von Eiweiß und Hopfenbitterstoffen, also allgemein gesprochen, zweier Kolloide, von denen zwar jedes für sich für die Schaumhaltigkeit Bedeutung besitzt, ihre Kombination jedoch einen weit über die Summenwirkung hinausgehenden Effekt zeigt.

Lüers und Moninger (l. c. 288) zeigten am Gelatine-iso-Amylalkohol-Modell, daß Zusatz von Hefegummi die Schaumbildung und Schaumhaltigkeit recht erheblich fördert und zwar war das Maximum bei 0,1 % Gelatine und 0,08 % Hefegummi erreicht.

Windisch und Bermann (295) stellten am System Pepton (pos. geladen) und Kieselsäure (neg. geladen) ausgezeichnete Schaumhaltigkeit fest, welche die der einzelnen Komponenten weit übertrifft. Lüers und Moninger fanden diesen Befund am Gelatine-iso-Amylalkohol-Modell vollauf bestätigt. Die äußerlich als Opaleszenz in Erscheinung tretende Dispersitätsgradvergrößerung kann als Ursache der Schaumförderung betrachtet werden. Sie kam durch die Einwirkung entgegengesetzt geladener Kolloide zustande. Für das Bier sind mehrere Partner entgegengesetzter Ladung in Erwägung zu ziehen, z. B. die Gerbstoffe des Malzes und des Hopfens, vor allem aber die Bitterstoffe des Hopfens, alle negativ geladen, und ihnen gegenüberstehend die amphoteren Eiweißkolloide, welche je nach dem pH positive oder negative Ladung besitzen, wobei ihr isoelektrischer Punkt den Umladepunkt darstellt. Beim pH des Bieres von etwa 4,4—4,6 beginnt die positive Ladung der hochmolekularen Stickstoffverbindungen des Bieres ausgeprägter zu werden. Blom (1. c. 289) suchte durch Zusatz von NaOH und Salzsäure das pH des Bieres zu verändern und damit den pH-Einfluß auf die Schaumhaltigkeit zu ermitteln. Er fand das unveränderte Originalbier von pH 4,42 als das in der Schaumhaltigkeit beste. In anderen Versuchen fand Blom eine Verbesserung der Schaumhaltigkeit bei Zusatz sehr geringer Mengen von Milchsäure zum Bier. Hartong (1. c. 192) stellte in neuester Zeit ähnliche Versuche an und fand die Optimale Schaumhaltigkeit bei pH rund 4,0 gelegen, also beim selben pH, bei dem das Optimum der Kältetrübung liegt, sodaß die alte Erfahrungstatsache sich bestätigt findet, daß ein vom Standpunkt der Schaumhaltigkeit aus gesehen sehr gutes Bier, ein in Bezug auf die physikalische Stabilität schlechtes Bier oder umgekehrt ist. Wir möchten jedoch darauf aufmerksam machen, daß unseres Erachtens ein beträchtlicher Unterschied besteht, ob man in einem fertigen Bier nachträglich durch Säure- oder -Basenzusatz das pH verändert, oder ob man den Brauprozess vom Einmaischen an so leitet, daß Biere von verschiedenen pH resultieren, also das ganze System harmonisch ins Gleichgewicht gekommen ist. Von diesem Gesichtspunkt aus sollten weitere Versuche gemacht werden, um die Frage nach dem Einfluß des pH auf die Schaumhaltigkeit zu klären.

Einen großen Umfang nehmen in der Literatur die Erfahrungen und Beobachtungen über den Einfluß praktischer Belange und Maßnahmen auf die Schaumhaltigkeit ein. Aus der Fülle des vorliegenden Materials sollen nur ein paar Hinweise, die sich ausgesprochen auf den Stickstoff beziehen, gebracht werden.

Krauss und Harreis (1. c. 293) finden, daß Gersten gleichen Stickstoffgehaltes und gleicher Verarbeitung in Mälzerei und Sudhaus die Schaumhaltigkeit der Biere verhältnismäßig unbedeutend beeinflussen. Bei größeren Unterschieden im Stickstoffgehalt, erwies sich nach Blom (1. c. 289) eine Gerste mit 2,1 % N einer solchen mit 1,6 % N in der Schaumhaltigkeit überlegen.

Was Mälzerei und Sudhaus anbelangt, so kann man kurz zusammenfassend als allgemeine Erfahrung aussprechen, daß ein mäßiger, nicht zu weit getriebener Abbau der Eiweißkörper für die Schaumhaltigkeit am günstigsten ist.

Das Gleiche gilt für die Klärungs- und Ausscheidungsvorgänge, die mit Maß und Ziel, nicht zu extrem durchgeführt werden sollen. (Siehe hierzu den Abschnitt Filtration).

Von Einfluß auf die Schaumhaltigkeit erweist sich das Abfüllen des Bieres, worüber besonders Helm und Richardt (296) ausgedehnte Versuche anstellten. Dabei zeigte sich, daß insbesondere die mit Luft und Sauerstoff, aber auch Stickstoff abgefüllten Biere die beste Schaumhaltigkeit besaßen, was von Blom (1. c. 289) auf physikalische Eigentümlichkeiten dieser Gase (Löslichkeit, Diffusionsvermögen) zurückgeführt wird. Auch hier finden wir wieder eine Divergenz der Ziele. Mit Rücksicht auf die Oxydationstrübung ist Abfüllen unter Ausschluß von Luft anzustreben, für die Schaumhaltigkeit dagegen verdient der Nichtausschluß der Luft den Vorzug. Die Vorteile des luftfreien Abfüllens sind aber u. E. gegenüber den in Kauf zu nehmenden Mängeln der Schaumhaltigkeit so groß, daß die luftfreie Abfüllung in der Praxis den Vorzug verdient.

Eine Behandlung des Bieres während oder vor dem Pasteurisieren mit proteolytischen Enzymen, setzt nach Helm und Richardt die Schaumhaltigkeit etwas herab und zwar wirkt Pepsin stärker als Papain.

Anhangsweise sei noch kurz auf das Wildwerden der Biere eingegangen (Überschäumen, Overfoaming, bières sauvages). Man versteht darunter einen Fehler des Bieres, der sich darin äußert, daß beim Öffnen der Flasche das Bier zu einem größeren oder kleineren Teil durch die sich plötzlich entbindende Kohlensäure heraus getrieben wird. Die hierüber bekannt gewordene Literatur findet sich bei Helm und Richardt (297), die sich in neuerer Zeit eingehend experimentell mit dem Problem des Wildwerdens befaßt haben. Es muß bezüglich Einzelheiten auf die sehr interessante Veröffentlichung der Autoren verwiesen werden. Hier interessiert uns die Frage, ob in irgend einer Weise etwa der Stickstoff an dem Phaeno-

men des Wildwerdens Anteil hat. Was aus der Arbeit von Helm und Richardt hierüber zu finden ist, lautet: Papain wirkt fast immer verstärkend, Pepsin meist vermindernd auf das Wildwerden. Tanninbehandlung, ebenso Zusatz von Pektin zum Bier waren ohne Einfluß. Ein gewisser Zusammenhang konnte zwischen der Oxydationstrübung und dem Wildwerden festgestellt werden und zwar dahingehend, daß, je stärker die erstere war, desto häufiger und stärker auch das Letztere in Erscheinung trat. Nochmaliges Pasteurisieren eines wild gewordenen Bieres setzt die Neigung zum Überschäumen herab. Zwischen Schaumhaltigkeit und der Übersäumungstendenz eines Bieres konnten bisher keine experimentell nachweisbaren Beziehungen festgestellt werden. Da das Wildwerden jahrgangsweise epidemisch auftreten kann, ist daran zu denken, daß bereits in der Gerste die Voraussetzungen für das Überschäumen liegen können.

Das ganze Problem bedarf noch intensiver, weiterer Bearbeitung.

Die Vollmundigkeit.

Eine am Bier geschätzte und gewünschte Eigenschaft, die es vor vielen anderen Getränken auszeichnet, ist die Vollmundigkeit. Sie spricht den Geschmackssinn an und wirkt sich daher mehr oder weniger subjektiv-individuell aus. Aus diesem Grunde sind exakte, quantitative Befunde über den Begriff der Vollmundigkeit kaum möglich. Doch versucht auch auf diesem Gebiete die experimentelle Psychologie allmählich zu konkreteren Vorstellungen zu gelangen. Für die Untersuchung der physikalisch-chemischen Vorgänge beim Schmecken hat Renqvist (298) den Begriff des Geschmackssystems eingeführt. Er versteht darunter die Geschmacksknospen und die schmeckende Lösung, der zum Teil auch Speichel beigemischt ist. Denn immer sind ja die Geschmacksknospen von Speichel bedeckt, durch den die Geschmackslösung hindurchdringen oder mit dem sie vermischt werden muß, um den Geschmacksreiz auszuüben. Das Geschmackssystem ist heterogen, denn es ist weder physikalisch noch chemisch gleichartig zusammengesetzt. Die von den Sinneszellen gebildete Phase ist vorwiegend kolloid, die Schmeckphase ist molekular und iondispers und enthält außerdem noch Kolloide. Renqvist hat es wahrscheinlich gemacht, daß bei der großen Oberflächenentwicklung der Geschmacksknospen von den in heterogenen Systemen obwaltenden Energiearten vor allem die Oberflächenenergien und elektrische Potentialdifferenzen für das Zustandekom-

men der Reizerscheinungen von Bedeutung sind, d. h. daß die beiden Prozesse der Adsorption und der Ausbildung von Potentialdifferenzen im Vordergrund stehen.

Wenn man sich die Sinneseindrücke vergegenwärtigt, die man beim Trinken von Bier erlebt, kann man Eindrücke auf den Geruchs-, Geschmacks-, Tast- und Temperatursinn feststellen. Die Tastsinneseindrücke rühren in erster Linie von der Kohlensäure des Bieres her, die sich beim Trinken an der rauhen Zungenoberfläche in verstärktem Maße entbindet und sich in einem feinen Prickeln, einer Empfindung von diskontinuierlichem Charakter, bemerkbar macht. Neben diesem groben Tastsinneseindruck geht noch ein weiterer feiner nebenher, der von der Berührung kolloider Teilchen des Bieres mit der Schleimhaut des Mundes herrührt. Diese Teilchen werden je nach Zahl, Größe und Format verschiedene Tastsinneseindrücke hinterlassen. Je nach dem höheren oder niedrigeren Koagulations- bzw. Dehydratationsgrad der Teilchen wird dieser Eindruck ein stärkerer und schärferer oder ein geringerer und milderer sein. Bei der Betrachtung der Schaumhaltigkeit haben wir gesehen, daß im Schaum eine Anreicherung von oberflächenaktiven Substanzen (Eiweiß, Hopfenbitterstoffe, Ester usw.) eintritt, daß ferner Kolloide in der Schaumphase unter Koagulation zur Häutchenbildung Veranlassung geben. Ein dem Aufschäumen analoger Prozeß wird sich auch am Geschmackssystem abspielen, auch hier kommt es zu weitgehenden Adsorptionen, ferner zur Ausbildung von Potentialdifferenzen zwischen den Geschmackszellenoberflächen und der umgebenden Schmecklösung, wodurch die Reizung des Tast- und Geschmackssinnes erfolgt. Die bekannten Zusammenhänge zwischen Schaumhaltigkeit und Vollmundigkeit können damit eine Erklärung finden.

Es erscheint durchaus die Ansicht, die übrigens die Erfahrung bestätigt, berechtigt, daß eine gute Schaumhaltigkeit die gleichen substantiellen und physiko-chemischen Grundlagen besitzt, die auch den Sinneseindruck einer guten Vollmundigkeit erwecken.

c) Die Zusammensetzung des Bieres.

Im Rahmen unserer Problemstellung interessieren hier wiederum nur die Stickstoffverhältnisse.

Der Stickstoffgehalt des Bierextraktes beträgt normalerweise 0,9—1,5 %, meist 1 %, oder auf Eiweiß umgerechnet etwa 5,5 bis 9 %, im Mittel 6,25 %. Die stickstoffhaltigen Substanzen werden gebildet

von: Hochmolekularen, koagulierbaren Proteinen (sehr geringe Mengen), Polypeptiden verschiedenen Molekulargewichtes, den früher Albumosen und Peptonen genannten Vertretern, bis herab zu einfachen Aminosäuren, ferner Amiden, Ammoniak-Stickstoff, Cholin und Betain. Die höheren Eiweißabbauprodukte bilden mit anderen organischen Substanzgruppen, aber auch mit Mineralstoffen Adsorptionsverbindungen oder Symplexe, z. B. Eiweiß-Gerbstoff-Kieselsäuresymplexe, welche, wie bei den Trübungen dargestellt, trotz ihrer sehr geringen Konzentration zu unliebsamen Störungen Anlaß geben können.

Von stickstoffhaltigen Farbstoffen sind die Melanoidine zu nennen, die in erster Linie beim Darren des Malzes, aber auch beim Maische- und Würzekochen entstehen. Bei dunklen Bieren kann ihre Menge bis etwa 2 g/L erreichen. Sie haben schuttkolloide Eigenschaften und wirken auch günstig auf die Schaumhaltigkeit ein. Auch Eiweiß-Gerbstoff- oder Eiweiß-Phlobaphenverbindungen können an der Farbe des Bieres, meist in ungünstigem Sinne beteiligt sein.

Zu den stickstoffhaltigen Verbindungen sind schließlich auch eine Reihe von Vitaminen zu zählen. In neuerer Zeit haben insbesondere englische und amerikanische Forscher nachgewiesen, daß im normalen Bier mehr Vitamine als man bisher annahm, vorkommen, womit der diätetische Wert des Bieres an Ansehen gewinnt. Es mag hier genügen, eine zusammenfassende Übersicht über den Vitamingehalt des Bieres und seiner Veränderungen im Brauprozess nach einer Veröffentlichung von Norris (299) zu bringen.

. Vitamine im Brauprozess (nach Norris).

Durchschnittswerte μ g/g. bzw. μ g/100 ccm bei Bier.

	Aneurin B ₁	Ribo- flavin B ₂	Nikotin- säure	Pyrido- xin B ₆	Panto- thensäure	Biotin
Gerste	5 — 7	1 — 3	80 — 150	3 — 4	4	0,14
Malz	4,5 — 6,5	2 — 4	90 — 130	6 — 8	5,5	0,17
Veränder. b. Mälzen	geringer Verlust	Zunahme 50% u. m.	geringe Veränd.	Zunahme fast 100%	deutl. Zun.	deutl. Zun.
Maischen	gering. Verlust	gering. Verlust	gering. Verlust	gering. Verlust	gering. Veränd.	gering. Verl.
Kochen	keine Aend.	keine Aend.	keine Aend.	etwas Verlust	geringe Veränd.	geringe Zun.
Gä- rung	Hefe	Starke Zun. d. Würze entzogen	synthet. d. Hefe	d. Würze entzogen	d. Würze synthet. entzogen d. Hefe	nicht synth. d. Hefe
	Würze	starker Verlust	Zunahme verschied.	etwas Verl.	etwas Verl.	kein Verlust manchmal Steig. an Hefe abge- geb.
Bier	2 — 6	30 — 120	0,2 — 2,0 mg	40 — 90	40 — 80	0,7 — 1,5

Nach Versuchen von O. Jung (300) verhielten sich die Stickstoffverbindungen des Bierextraktes bei der Dialyse durch Schweinsblasen wie folgt:

	% dialysierbar	% nicht dialysierbar
Gesamt-N	59,62	40,39
Phosphorwolfram- säure fällb. N	62,13	37,88
Amino-N	69,04	30,97

Daraus geht hervor, daß mehr als die Hälfte des Gesamtstickstoffs in verhältnismäßig niedermolekularer, dialysierbarer Form vorliegt. Wie nicht anders zu erwarten war, ist das Verhältnis beim Amino-N weit zu gunsten des dialysierbaren Anteils verschoben, während der durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff sich in seinem Verhalten nicht weit vom Gesamtstickstoff entfernt. Etwa 1—3 mg Stickstoff in 100 ccm 12%igem Bier sind durch intensives Kochen in koagulierbarer Form auszufallen.

Zum Schlusse sei noch kurz auf die Wandlungen hingewiesen, welche der in der Gerste enthaltene Stickstoff auf seinem Werdegang zum Bier in quantitativer Beziehung erfährt. Über dieses Gebiet hat in letzter Zeit Fink (301) sich ausführlich geäußert. Seinen Veröffentlichungen ist folgende übersichtliche Tabelle entnommen:

	Menge kg	Verdauliches Eiweiß in % der Trocken- substanz	Verhältnis von verdaulichem Eiweiß zum Stärkewert	Nährstoff verhältnis	Kalorien der ges. verdaulichen Nährstoffe
Gerste	100	9,3	6,0:71,4	1:11,9	362
Schwimm- gerste	0,4	9,3	6,0:71,4	1:11,9	362
Malzkeime	4,0	12,9	11,4:38,7	1: 3,4	284,49
Biertreber	20,0	18,8	14,1:50,3	1: 3,6	320
Hefe	1,0	46,1	42,4:68,2	1: 1,6	430,26
Trub	0,3	35,7	35,7:71,6	1: 2,0	—

Das Wichtigste, was aus dieser Tabelle hervorgeht, ist die Tatsache, daß sämtliche beim Brauprozeß anfallenden Nebenprodukte, nämlich Malzkeime, Treber, Hefe und Trub, sich gegenüber dem Ausgangsstoff Gerste durch ein enges Verhältnis von verdaulichem Eiweiß zu Stärkewert auszeichnen, was sie für die Tierernährung (Mast) sehr wertvoll macht. Der Brauprozeß führt also die Kohlehydrate im wesentlichen in das beliebte und wertvolle Bier über, während der Stickstoff in den Abfallprodukten angereichert der Tierernährung zur Verfügung steht.

Darüber hinaus aber ergaben sorgfältig durchgeführte ernährungswirtschaftliche Vergleiche, daß die Vermälzung und Verbrauung der Gerste in Verbindung mit der Verfütterung der eiweißreichen Nebenprodukte optimal, d. h. besser ist als jede Verwertungsform der Gerste für die menschliche Ernährung.

Anhang

Proteine und Stickstoffverbindungen der Hefe. Der Werdegang des Bieres ist mit der Hefe untrennbar verbunden. Die Vermehrung der Hefe bei der Gärung erfolgt auf Kosten des Würzeextraktes, der der Würze entnommene Stickstoff erscheint in der Hefe als Proteinstickstoff oder in Form zahlreicher anderer Stickstoffverbindungen. Aus diesen Gründen ist es angebracht, zur Vervollständigung und Abrundung unseres Themas in Kürze auch auf die Stickstoffverbindungen der Hefe einzugehen.

Der Gesamtproteingehalt einer normal ernährten Brauereihefe beträgt 50 % und mehr der Trockensubstanz. Von dem durch die Analyse ermittelten Rohproteingehalt ($N \times 6,25$) machen echte Proteine bis zu 80 bis 85 % aus.

Nach Kraut und Schlottmann (302) lieferte das Bierhefenprotein in seiner Gesamtheit nach der Hydrolyse folgende Durchschnittswerte:

Humin-N	3— 4 %	Lysin	10,0 %
Ammoniak-N	16 %	Cystin	1,5—1,6 %
Ges. N. der Basenlös.	25—29 %	Ges. N d. Basenfiltr.	53—54 %
Amino-N d. Basenlös.	15—16 %	Amino-N des Basen-	
Nichtamino-N der		filtr.	48,4—49,3 %
Basenlösung	9,6—13,6 %	Nichtamino-N des	
Arginin	11—11,8 %	Basenfiltr.	4,5—4,7 %
Histidin	2,3—5,9 %	Tryptophan	0,9 %
		Tyrosin	2,5 %

Die Analyse läßt, soweit dies eine solche vermag, erkennen, daß das Hefeeiweiß eine günstige Zusammensetzung besitzt. Ein bindendes Urteil über den biologischen Wert derselben ließ sich jedoch nur

auf dem Wege ernährungsphysiologischer Versuche am Tier gewinnen, die von Fink und Mitarbeitern (303) durchgeführt wurden. Sie ergaben, daß Bier-Hefeeiweiß zu den biologisch hochwertigen Eiweißarten gehört und bei abgestuftem Ersatz von tierischem Eiweiß z. B. Fischeiweiß, dieses bis zu einem Mischungsverhältnis von etwa $\frac{2}{3}$ Hefeneiweiß und $\frac{1}{3}$ Fischeiweiß zu ersetzen vermag. Bei vollem Ersatz von tierischem Eiweiß erweist sich das Bierhefееiweiß als eindeutig unterlegen und zwar deshalb, weil nur eine einzige Aminosäure, das Cystin (oder Methionin) in ungenügender Menge in ihm enthalten ist. Gibt man diese Aminosäure in einer Menge von 2% dem Hefeneiweiß zu, so wird es dem tierischen Eiweiß (Milch, Fisch) gleichwertig.

Die einzelnen Proteine der Hefe wurden von Thomas (304) und Fodor (305) isoliert und erstmals näher beschrieben. Durch Extraktion getrockneter oder plasmolysierter Hefe mit schwach alkalischem Wasser gehen Proteine der Hefe in Lösung. Durch Ansäuern bis pH 4,5 fällt das Phosphorprotein „Zymocasein“ aus, während aus dem Filtrat das Albumin „Cerevesin“ durch Erhitzen koaguliert oder durch Ammonsulfat ausgesalzen werden kann. Die Verteilung des Stickstoffs in beiden Proteinen geht aus einer von Bayer (305a) durchgeführten Hydrolyse und Differenzierung des Stickstoff nach D.D. van Slyke hervor.

	Cerevesin	Zymocasein
Ammoniak-N	5,84	8,33
Melanin-N	1,20	2,28
Cystin-N	1,14	0,91
Arginin-N	10,68	11,62
Histidin-N	2,75	4,77
Lysin-N	12,76	9,89
Amino-N im Basenfiltr.	62,95	49,92
Nicht-Amino-N im Basenfiltr.	2,33	8,87
Sa	99,65	96,59

Das Zymocasein ist ein typisches Phosphorprotein, dessen Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit dem tierischen Casein zeigt, dem es näher steht als dem pflanzlichen Legumin. Wie beim Casein darf auch hier angenommen werden, daß die Phosphorsäure in Esterform an die Hydroxylgruppe des Serins gebunden ist.

Eine Hydrolyse des Zymocaseins mit nachfolgender Trennung und Isolierung der einzelnen Aminosäuren führten Lüers und Novak (306) mit folgendem Ergebnis durch:

Hydrolyse des Zymocaseins:	% des Gesamt-N
Glycocoll-N	7,37
Alanin-N	1,72
Valin-N	—
Leucin-N	3,18
Isoleucin-N	—
Phenylalanin-N	0,87
Tyrosin-N	2,37
Serin-N	—
Cystin-N	0,74
Prolin-N	4,18
Oxyprolin-N	—
Asparaginsäure-N	—
Glutaminsäure-N	19,50
Tryptophan-N	1,48
Arginin-N	8,39
Lysin-N	11,45
Histidin-N	3,53
Ammoniak-N	9,26
Melanin-N	2,25
Purinbasen-N	0,60
Summe	76,89

In Alkalien ist das Zymocasein unter Caseinatbildung löslich, bei pH 4—4,5 zeigt es seine geringste Löslichkeit und fällt beim Ansäuern der alkalischen Lösung je nach der Konzentration aus oder bildet kolloid-disperse, getrübe Lösungen. In stärkeren Säuren erfährt es nach Lüers und Schuster (307) eine Quellung, die schließlich zu völliger Lösung führt. Für Salzsäure liegt das Quellungsmaximum bei pH 2,0, für Schwefelsäure bei pH 1,9, für Phosphorsäure bei pH 1,64. Salze erniedrigen die Säurequellung des Zymocaseins. Kolloidchemisch verhält sich dieses Protein ganz analog dem von J. Loeb untersuchten Casein.

Das Hefealbumin, Cerevesin, ist ein typisches Albumin, das physikalisch-chemisch und kolloidchemisch völlig den anderen Albu-

Ähnliches gilt auch für verschiedene stickstoffhaltige Wirkstoffe, bei welchen ebenfalls die physiologische Wirkung die quantitative Bedeutung ihres Vorkommens bei weitem überwiegt. Nur in kurzer summarischer Aufzählung wären hier folgende Vertreter zu nennen: Vitamin B₁, Riboflavin (Vitamin B₂), Nicotinsäureamid (Antipellagrafaktor), Pyridoxin (Vitamin B₆), Z-faktor, die Wuchsstoffe Pantothensäure, Folinsäure, β -Alanin, Biotin, p-aminobenzoessäure (Vitamin H') und schließlich die im einzelnen nicht aufführbaren Enzyme, die entweder als Apoferment ein Hefeprotein oder als Coferment eine Stickstoffgruppe oder beides zusammen besitzen. Die Hefezelle enthält davon ein ganzes Arsenal und stellt mit ihrer in den Dimensionen der mikroskopischen Zelle wirkenden Organisation das modernste biochemische Institut in den Schatten.

Literaturverzeichnis

Abkürzungen, soweit sie nicht ohne Weiteres verständlich sind.

Bioch. J. = Biochemical Journal

Bioch. Z. = Biochemische Zeitschrift

Brauwes. = Zeitschrift für das gesamte Brauwesen

Compt. rend. Carlsberg = Comptes rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg

J. Inst. Brew. = Journal of the Institute of Brewing

Koll. Beih. = Kolloidchemische Beihefte

Koll. Z. = Zeitschrift für Kolloidchemie

Wo. Br. = Wochenschrift für Brauerei

1. Osborne Th. The vegetable Proteins, London, J. Amer. Chem. Soc. **17**. 539
2. Lüers H. u. Landauer M. Z. f. Elektrochem. **1922**. 341.
3. Lundin H. Intern. Congr. f. Fermentat. Ind. Gent 1947. Ref. Mitt. Vers. Anst. f. d. Gär. gew. Wien **1947**. H 5/6.
4. Sandegren E. Congr. of the Contin. Brewery Center, Scheveningen 1947. Compt. rend. S. 25.
5. Meyer K. H., Fischer E. u. Bernfeld P. Helv. Chim. Acta **30**. 64 (1947).
6. Holwerda K. Bioch. Z. **279**. 353, 1935 Ref. Wo. Br. **1935**. 348.
7. Lundin H. Wo. Br. **1938**. 241, 249 u. 259.
8. Svedberg The u. Stamm. A. J. J. Am. Chem. Soc. **51**. 1720. 1929. Ref. Wo. Br. **1929**. 415.
9. Quensel O. u. Svedberg The. Compt. rend. Carlsberg Sér. chim. **22**. 441. (1937)
10. Säverborn S., Danielsson K. E. u. Svedberg The, Svensk chem. Tidskr. **56**. 75. (1944).
11. Anderson R. C. u. Anderson J. Canad. J. of Res. **14**. 109. 1936. Ref. Wo. Br. **1936**. 316.
12. Rose R. C. u. Anderson J. Wo. Br. **1936**. 316.
13. Moufang E. Brauwes. **1913**. 133.
14. Leberle H. u. Lüers H. Brauwes. **1914**. 321.
15. Schjernerling H. Compt. rend. Carlsberg 1914. Ref. Wo. Br. **1915**. 41 u. Brauwes. **1916**. 355.
16. Windisch W., Dietrich W. u. Mehlitz. Wo. Br. **1923**. 1.
17. Myrbäck K. u. Myrbäck S. Wo. Br. **1931**. 43; **1932**. 20.
18. Bishop L. R. Wo. Br. **1928**. 325; **1929**. 340, 361; **1933**. 391.
19. Kieferle F. Dissert. Techn. Hochsch. München 1919.

20. Lüers H. u. Geiger O. Wo. Br. 1935. 193.
21. Grüß J. Wo. Br. 1899. 352.
22. Windisch W. u. Kolbach P. Wo. Br. 1929. 459.
23. Nielsen N. Wo. Br. 1936. 265.
24. Bishop. loc. cit. 18.
25. Hofmann-Bang. J. Inst. Brew. 1931. 72.
26. Fink H. u. Kunisch G. Wo. Br. 1937 193, 305, 365
27. Piratzki W. u. Wiecha G. Wo. Br. 1939. 63.
28. Moufang E. Das Bier.
29. Lüers H. u. Hüttinger W. Wo. Br. 1933. 97.
30. Ehrich E. Allg. Br. u. Hopf. Ztg. 1933. 748. Ref. Wo. Br. 1933. 395,
31. Žila V. V., Trkan M. u. Skvor F. Wo. Br. 1942. 27; 1941. 253.
32. Bauer P. Wo. Br. 1933. 520.
33. Haase G. Wo. Br. 1906. 35.
34. Neumann O. Wo. Br. 1932. 281.
35. Cluß A. u. E. Wo. Br. 1909. 81.
36. Schmidt J. Brauwes. 1909. 332.
37. Bishop L. R. J. Inst. Brew. 1930. 421; 1933. 545. Ref. Wo. Br. 1932. 243; 1933 407.
38. Kolbach P. Wo. Br. 1932. 243.
39. Novotny u. Karabec. Boehm. Bierbr. 1935. Nr. 13.
40. Bishop L. R., J. Inst. Brew. 1934. 75. Ref. Wo. Br. 1934. 176.
41. Thunnäus H. u. Schröderheim J. Wo. Br. 1935. 357.
42. Russel E. J. u. Bishop L. R. J. Inst. Brew. 1933. Nr. 7. Ref. Wo. Br. 1933. 294.
43. Weinmann H. Ernähr. d. Pflanze 29. 261, 1933; Ref. Wo. Br. 1933. 320.
44. Krügel C., Dreyspring u. Kurth, Z. f. Pflanzenernähr. 12. 12. 1923. Ref. Wo. Br. 1933. 128.
45. Lüers H. Bioch. Z. 104. 30. 1920.
46. Chapman Ch. Ref. Wo. Br. 1923. 21.
47. Lüers H. u. Stauber J. Wo. Br. 1930. 557.
48. Mündler K. Brauwes. 1933. Nr. 16-24; 1934. 1-6. Ref. Wo. Br. 1934. 112.
49. Vines S. H. Ann. of Botany. 19. 171. 1905; 20. 113. 1906; 22. 103. 1908.
50. Weiß F. Ref. Brauwes. 1903. 301; 1904. 385.
51. Lundin H. Bioch. Z. 131. 193. 1922.
52. Windisch W. u. Schellhorn B. Wo. Br. 1900. 334.
53. Linderström-Lang K. Z. physiol. Chem. 173. 32. 1928.
54. Koch J. R., Nelson O. u. Ehrnst L. Ind. Eng. Chem. Am. Ed. 11. 35. 1939. Ref. Wo. Br. 1939. 233. 288.
55. Landis u. Frey. Ref. Chem. Zentr. bl. 1938. I. 3406.
56. Komazawa T. Ref. Wo. Br. 1940. 168. 214.
57. Idoux L. Brass. et Malt. 23. 122. 1933. Ref. Wo. Br. 1933. 288.
58. Kolbach P. u. Simon H. Wo. Br. 1936. 297.
59. Lüers H. u. Malsch L. Wo. Br. 1929. 265.
60. Euler H. v., Myrbäck K. u. Myrbäck S. Ber. D. Chem. Ges. 62. 2194. 1929.
61. Linderström-Lang K. u. Mill. C. R. Compt. rend. Carlsberg 17. Nr. 10. 1929.
62. Ambros. O. u. Harteneck A. Z. f. physiol. Chem. 184. 93. 1929.
63. Hopkins R. H. Bioch. J. 22. 1022. 1929. Ref. Br. 1930. 39.
64. Linderström-Lang K. u. Sato M. Compt. rend. Carlsberg 19. Nr. 1. 1931. Z. f. phylol. Chem. 184. 83. 1929.

65. Linderström-Lang K. u. Holter H. Z. f. physiol. Chem. **201**. 9. 1931; **204**. 51. 1932.
66. Kolbach P. Wo. Br. **1937**. 1.
67. Blagoveschensky A. V. u. Sossiedow N. J. Bioch. J. **27**. 1575. 1933.
68. Holter H. Z. f. physiol. Chem. **196**. 1. 1931.
69. Northrop J. H. J. Gen. Physiol. **15**. 29. 1931.
70. Kosmin N. Z. ges. Mühlenwes. **1930**. Nr. 2/3; Chem Zentr. bl. **1938**. II. 1062.
71. Lüers H. u. Hüttinger W. Wo. Br. **1934**. 365.
72. Lüers H. u. Löther A. Wo. Br. **1935**. 49.
73. Waldschmidt-Leitz E. u. Purr A. Z. f. physiol. Chem. **203**. 117. 1931.
74. Takahashi u. Shirahama. J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ. **30**. 119. 1931/32
75. Rose R. C. u. Anderson J. Ref. Wo. Br. **1936**. 316
76. Lüers H. Bioch. Z. **96**. 117. 1919; **133**. 303. 1922.
77. Kraft. Brauwes. **1910**. 193
78. Lüers H. u. Loibl H. Brauwes. **1923**. 3.
79. Schild E. Wo. Br. **1935**. 321.
80. Kolbach P. u. Antelmann. Wo. Br. **1937**. 123.
81. Windisch W., Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. **1930**. 357.
82. Schjerning. H. Compt. rend. Carlsberg **6**. 229. 1906; **8**. 229, 1910; **9**. 237. 1913; Wo. Br. **1915**, 41.
83. Lüers H. Wo. Br. **1928**. 569.
84. Krauß G. Wo. Br. **1932**. 113.
85. Kolbach P. Wo. Br. **1935**. 17.
86. Lüers H. Brauwes. **1921**. 199.
87. Kolbach P. u. Buse R. Wo. Br. **1933**. 249.
88. Stadnik A. Boehm, Bierbr. **1932**. 167.
89. Myrbäck K. u. Myrbäck S. Wo. Br. **1931**. 43; **1932**. 20.
90. Rokita W. u. Gfundner E. Wo. Br. **1933**. 225.
91. Dinklage K. Brauwes. **1903**. 385; **1904**. 249.
92. Bishop L. R. Ref. Wo. Br. **1931**. 361.
93. Kolbach P. Wo. Br. **1933**. 343; **1935**. 17.
94. Langkammerer u. Leberle. Brauwes. **1919**. 236.
95. Menzel O. Wo. Br. **1935**. 105; **1927**. 490.
96. Thunnäus H. u. Schröderheim I. Wo. Br. **1935**. 357.
97. Hind L. Ref. Wo. Br. **1934**. 171.
98. Hopkins-Krause, Bioch. appl. to Malt. and Brew. S. 147.
99. Piratzki W. u. Wiecha G. Wo. Br. **1937**. 225.
100. Kolbach u. Antelmann. Wo. Br. **1937**. 123.
101. Schmidt A. Wo. Br. **1936**. 48.
102. Kolbach P. und Schild E. Wo. Br. **1939**. 349.
103. Stadler H. Wo. Br. **1929**. 479.
104. Fink H. Wo. Br. **1933**. 397.
105. Kolbach P. Wo. Br. **1935**. 17.
106. Dickson J. C. Amer. Brew. **73**. 48. 1940. Ref. Wo. Br. **1941**. 48.
107. Kolbach P. u. Antelmann. Wo. Br. **1937**. 134.
108. Barth G. u. Dinklage K. Brauwes. **1903**. 601.
109. Lüers H. u. Nishimura S. Brauwes. **1924**. 21. Ref. Wo. Br. **1925**. 2.
110. Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. **1935**. 129.
111. Schild E. Wo. Br. **1935**. 321.
112. Lüers H., Stricker F. u. Schild E. Wo. Br. **1938**. 35.

113. Lüers H. Wo. Br. **1927**. 7.
114. Enders C. Koll. Z. **85**. 74. 1938; Wo. Br. **1943**. 98. Brennstoffchemie **19**. 360. 1938.; Bioch. Z. **316**. 303. 1944.
115. Novak G. Wo. Br. **1938**. 377; **1939**. 217.
116. Windisch W., Kolbach P. u. Wentzel E. Wo. Br. **1925**. 313.
117. Kolbach P. Wo. Br. **1938**. 10; **1937** 341.
118. Enders C. u. Wieninger F. Wo. Br. **1939**. 129.
119. Baumann A. Brauwes. **1916**. 363.
120. Kolbach P. u. Antelmann. Wo. Br. **1937**. 134.
121. Jalowetz E. Brau- u. Malzindustr. **23**. 65. 1930.
122. Brown H. T. u. Millar. Ref. Wo. Br. **1907**. 108.
123. Hashitani J. Ref. Wo. Br. **1926**. 347.
124. Joshimura K. Bioch. Z. **31**. 221. 1911.
125. Raoul J. Ann. d. Ferment. **30**. 193. 1937. Ref. Wo. Br. **1938**. 16.
126. Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. **1934**. 185.
127. Bleyer B., Diemair W., Fischler F. u. Täufel K. Biochm. Z. **286**. 408; **289**. 27. 1936; **292**. 301. 1937.
Die Ernährung **1**. 181, 1936; **3**. 30. 1938.
128. Schjerning H. Brauwes. **1916**. 392.
129. Schönfeld F. Wo. Br. **1904**. 257.
130. Mertens Wo. Br. **1925**. 72.
131. Kolbach P. Wo. Br. **1932**. 369; **1933**. 265.
132. Windisch W., Kolbach P. u. Hennecke. Wo. Br. **1928**. 389.
133. Lundin H. u. Schröderheim J. Wo. Br. **1931**. 347.
134. Fink H. u. Wildner H. Wo. Br. **1930**. 11.
135. Myrbäck K. u. Myrbäck S. Wo. Br. **1931**. 43.
136. Kolbach P. u. Buse R. Wo. Br. **1933**. 249.
137. Stadnik A. Boehm. Bierbr. **1932**. 167.
138. Stadnik A. Boehm. Bierbr. **1931**. Nr. 1—5.
139. Kolbach P. u. Buse R. Wo. Br. **1933**. 265.
140. Windisch W., Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. **1931**. 253.
141. Kolbach P. u. Simon H. Wo. Br. **1937**. 1.
142. Lüers H., Krauß G., Hartmann u. Vogt. Wo. Br. **1934**. 361.
143. Windisch W. u. Kolbach P. Wo. Br. **1929**. 41.
144. Kolbach P. Wo. Br. **1935**. 213; **1934**. 209; **1936**. 309; **1940**. 250.
145. Kolbach P., Hausmann G. u. Wilharm G. Wo. Br. **1935**. 233.
146. Schütza M. Wo. Br. **1935**. 227.
147. Lüers H. u. Schrempp. W. Wo. Br. **1929**. Nr. 46
148. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. **1940**. 209.
149. Schild E. Wo. Br. **1936**. 345.
150. Schreder K., Brunner R. u. Hampe R. Wo. Br. **1937**. 83.
151. Kolbach P. u. Rehberg R. Wo. Br. **1941**. 1, 35, 55.
152. Jakob G. Wo. Br. **1929**. 454. D. R. P. 559 162.
153. Morraye Cl. Pet. J. d. Brass. **1938**. 464. Ref. Wo. Br. **1939**. 199.
154. Chabot. Pet. J. d. Brass. **1939**. 351. Ref. Wo. Br. **1939**. 199.
155. Wellhoener H. Wo. Br. **1940**. 149.
156. Enders C. u. Novak G. Wo. Br. **1939**. 243; **1940**. 137; D. R. P. 687 847.
157. Hartong B. D. Wo. Br. **1937**. 33. 321.
158. Windisch W., Kolbach P. u. Vogl. Wo. Br. **1929**. 403..
159. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. **1936**. 145.
160. Lüers H. Brauwes. **1920**. 59.
161. Hopkins u. Krause. Bioch. appl. to Malt. and Brew.

162. Kutter F. u. Siegfried H. Wo. Br. 1934. 401.
163. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. 1940. 145.
164. Kutter F. Schweiz. Brau. Rundsch. 1934. 257. Ref. Wo. Br. 1934. 399.
165. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. 1934. 57.
166. Horch R. u. Schulteis. Wo. Br. 1929. 295.
167. Lüers H. u. Niedermaier H. Wo. Br. 1940. 125.
168. Hartong B. D. Wo. Br. 1929. 543.
169. Kolbach P. Jahrb. V. L. B. 1934. 288; 1939. 41.
170. Stadler H. u. Reidt. Wo. Br. 1932. 337.
171. Windisch F. D. Brauereitechn. 1941. 82, 94, 108; 1942. Jan.—März.
172. Kolbach P. u. Kleber W. Wo. Br. 1937. 257.
173. Kolbach P. Wo. Br. 1939. 41.
174. Windisch W., Kolbach P. u. Vogl. Wo. Br. 1931. 139; 1933. 421.
175. D. R. P. 706 121. Ref. Wo. Br. 1941. 152.
176. Gray P. P., Stone J. u. Rothchild H. Wallersteins Communic. 1939. Nr. 7. Ref. Wo. Br. 1940. 69.
177. Hartong B. D. u. Ludert. J. R. A. Wo. Br. 1940. 279.
178. Enders C. Wo. Br. 1943. 98.
179. Bleisch u. Schweitzer. Brauwes. 1889. 515.
- 179a. van Laer M. J. Inst. Brew. 1939. 206. Ref. Wo. Br. 1939. 148. Ann. d. Ferment. 1938. Nr. 7 Ref. Wo. Br. 1939. 173.
180. Enders C. Wo. Br. 1937. 188.
181. Windisch F. Wo. Br. 1929. 325.
182. Kutter F. Wo. Br. 1935. 1.
183. Jakob G. Wo. Br. 1935. 73.
- 183a. Lüers H. u. Wiedemann C. Brauwes. 1924. 33.
184. Kutter F. u. Siegfried H. Wo. Br. 1934. 408.
185. Enders C. u. Spiegl A. Wo. Br. 1937. 97.
186. siehe 183a.
187. Hartong B. D. Wo. Br. 1937. 324.
188. Schild E., Enders C. u. Spiegl A. Wo. Br. 1936. 273.
189. Reichard A. Brauwes. 1881. 533.
190. Brown H. T. Wo. Br. 1913. 179.
191. Shimwell J. L., Kirkpatrick W. F. u. Baylis P. H. J. Inst. Brew. 1938. 270; 1936. 366. Ref. Wo. Br. 1938. 197; 1937. 75.
192. Hartong B. D. Proteins in Brewing. Symposion on Proteins. Amsterdam 1938.
193. Fink H. u. Riedel. W. Wo. Br. 1930. 491; 1931. 391.
194. Helm E. Wo. Br. 1936 393; 1939 185.
195. Enders C. Wo. Br. 1937. 405.
196. Hartong B. D. Wo. Br. 1937. 321.
197. Bungenberg de Jong. Rec. trav. chim. Pays-Bas 1923. 437, 472; 1924. 35; 1927. 727; Koll. Beihefte 29.. 432.
198. Rubner M. Ernährungsphysiol. d. Hefezelle. Veith u. Co. 1913.
199. Hartelius V. Wo. Br. 1938. 177.
200. Fulmer u. Christensen. Ref. Wo. Br. 1926. 338.
201. Schanderl H. Wo. Br. 1942. 59.
202. Pirschle K. Bioch. Z. 218. 412. 1930. Ref. Wo. Br. 1930. 475. 529.
203. Windisch W. u. Windisch F. Wo. Br. 1931. 106.
204. Neubauer u. Frommherz. Z. f. physiol. Chem. 70. 326. 1910.
205. Franke W. Die Chemie 52. 625. 1939.
206. Thorne R. S. W. J. Inst. Brew. 39. 597. 1933.

207. Jllies R. Wo. Br. 1938. 405.
208. Nielsen N. Ergebnisse der Biologie 19. 375. 1943.
209. Hartelius V. Bioch. Z. 299. 317. 1938. Ref. Wo. Br. 1939. 224.
210. Euler H. v., Adler E. u. Steenhoff-Eriksen. Z. f. physiol. Chem. 248. 227. 1937. Ref. Wo. Br. 1937. 356.
211. Edlbacher S. u. Segesser A. v. Naturwiss. 1938. 267. Z. f. physiol. Chem. 255. 53. 1938; Ref. Wo. Br. 1938. 232. 352.
212. Keil W. Z. f. physiol. Chem. 207. 275. 1932; Ref. Wo. Br. 1932. 192.
- 212a. Thorne R. S. W. J. Inst. Brew. 52. 5. 15. 1946; 50. 186. 1944. 51. 6. 1945. Ref. Brewers Digest 1947. Dez. S. 58.
213. Janke A. Z. f. Bakter. II. 100. 409, 1939. Ref. Wo. Br. 1939. 285.
214. Fulmer E. J., Underkofler L. A. u. Lesh J. B. J. Amer. Chem. Soc. 58. 1356. 1936. Ref. Wo. Br. 1938. 15.
215. Iwanoff N. N. u. Krupkina. F. A. Bioch. Z. 212. 255. 1929. Ref. Wo. Br. 1929. 503.
216. Nielsen N. Compt. rend. Carlsberg 19. Nr. 16. 1933. Ref. Wo. Br. 1933 433.
217. Hayduck M. Z. f. Spiritusind. 1881.
218. Mohr. Wo. Br. 1886. 200.
219. Heß E. M. Z. oest. Brau- u. Gär-Gew. 19. 1. 1942. Ref. Wo. Br. 1942. 85.
220. Kolbach P. u. Strömberg C. Wo. Br. 1943. 19.
221. Hayduck M. Z. f. Spiritusind. 1881. 173.
222. Schönfeld F. u. Hirth. Wo. Br. 1911. 421.
223. Euler H. v. u. Mitarb. Bioch. Z. 249. 245, 1932. Ref. Wo. Br. 1932. 312. Z. f. physiol. Chem. 208. 281. 1932. Ref. Wo. Br. 1932. 352.
224. Kögl F. u. Borg W. A. J. Z. f. physiol. Chem. 269. 97. 1941.
225. Windisch W., Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. 1931. 193.
226. Windisch W., Kolbach P. u. Schild E. Wo. Br. 1930. 327.
227. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. 1936. 145.
228. Stadnik A. Boehm. Bierbr. 1932. 167. Ref. Wo. Br. 1932. 215
229. Fink H. u. Wildner H. Wo. Br. 1930. 11.
230. Windisch W., Kolbach P. u. Wentzel E. Wo. Br. 1925. 313.
231. Geys K. Wo. Br. 1928. 3.
232. Lampitt. L. H. Bioch. J. 23. 459. 1919.
233. Euler H. v. u. Sandberg. Z. f. physiol. Chem. 146. 290. 1925.
234. Euler H. v. u. Fink H. Z. f. physiol. Chem. 157. 222. 1926.
235. Hayduck M. Z. f. Spiritusind. 1881. Nr. 9.
236. Pringsheim H. Bioch. Z. 3. 121. 1907.
237. Thorne R. S. W. J. Inst. Brew. 1933. 608.
238. Nielsen N. u. Hartelius V. Wo. Br. 1937. 129; 1938. 149. Ergebn. der Biologie 19. 375. 1943.
239. Hartelius V. Wo. Br. 1938. 177.
240. Nielsen N. Wo. Br. 1936. 113.
241. Lüers H. u. Landauer M. Brauwes. 1922. 159.
242. Lüers H. u. Ottensooser F. Bioch. Z. 148. 130. 1924.
243. Wöllmer W. Tagesz. f. Br. 1935. 711.
244. fällt aus.
245. Geys K. Brauwes. 1923. 3
246. Ostwald Wo., Siehr A. u. Mischke W. Koll. Z. 76. 33. 1936; 90. 17. 77. 205. 1940 .
247. Hartong B. D. Wo. Br. 1929. 11; 1932. 27.
248. Emslander F. Wo. Br. 1926. 418.

249. Glimm E. u. Stentzel F. Brauwes. **1931.** 49.
250. Windisch W., Reimers u. Hirschbruch Wo. Br. **1915.** 1.
251. Ehrlich F. u. Pringsheim H. Bioch. Z. **1907.** 121. 284.
252. Lüers H. Brauwes. **1921.** 203.
253. Wirth Chr. Wo. Br. **1944.** 13.
254. Belgeonne M. W. Le petit J. d. Brass. **1937.** 887 Ref. Wo. Br. **1938.** 309.
255. Grant J. J. Inst. Brew. **1937.** 417. Ref. Wo. Br. **1938.** 309.
256. Browns J. A. J. Inst. Brew. **1937.** 417. Ref. Wo. Br. **1938.** 309.
257. Ernst J. Allg. Br. u. Hopf. Ztg. **1936.** 13.
258. Lüers H. Wo. Br. **1936.** 57.
259. Delbrück M. u. Mayduck F. Die Gärführung. Parey, Berlin 1911.
260. Keil Wo. Br. **1913.** 340.
261. Harder, Lehmann u. a. Wo. Br. **1913.** 44.
262. Fink H. u. Berwald E. Wo. Br **1933.** 327.
263. Geys K. Brauwes. **1922.** 2.
264. De Clerck J. Bull, éc. sup. brass. Univ.-Louvain **1931.** 67. Ref. Wo. Br. **1931.** 409.
265. Hartong B. D. Wo. Br. **1938.** 132.
266. Kretschmer K. u. Emslander E. Wo. Br. **1935.** 113.
267. Richardt O. C. u. Helm E. Wo. Br. **1934.** 257.
- 267a. Lüers H. Schweiz. Brau.-Rundschau **58.** 130. 1947.
268. Helm E. Wo. Br. **1936.** 393; **1937.** 241.
269. Lüers H. V. Congr. Int. techn. Chem. Ind. Agric. Scheveningen 1937.
270. Enders C. Wo. Br. **1937.** 405.
271. Helm E. Wo. Br. **1934.** 105.
272. Lüers H. u. Enders C. Compt. rend. Carlsberg Sér. chim. **22.** 329. **1937.** Ref. Wo. Br. **1938.** 141.
273. Helm E. Wo. Br. **1939.** 185.
274. Hartong B. D., Enders C. u. Saji. Wo. Br. **1939.** 153. 329.
275. Hesselberger Wo. Br. **1929.** 285.
- 275a. Kolbach P. u. Wilharm G. Wo. Br. **1943.** 74.
276. Lüers H. u. Landauer M. Brauwes. **1922.** 159.
277. Visez. Wo. Br. **1922.** 33. 38. 78; **1923.** 115.
278. Emslander F. Preisschrift Kolloid. Beih. III. 47.
279. Dietsche H. Wo. Br. **1940.** 181. **1942.** 87.
280. Siebel. Wo. Br. **1898.** 48.
281. Chabot G., Delie P. u. Gaeremynck G. Bières et Boissons **1941.** 429. Ref. Wo. Br. **1941.** 213.
282. Dehnike. Wo. Br. **1908.** 225.
283. Fries. Wo. Br. **1897.** 498.
284. Matthews. J. Inst. Brew. **1929.** 181.
285. Gray P. P. u. Stone. J. J. Inst. Brew. **1939.** 443.
286. Hartong B. D. On Beer Foam. Congr. 1947 (Scheveningen). of the Contin. Brewery Center, Proceed. a. Discuss. S. 111.
287. Ostwald Wo. u. Meißner M. Koll. Beih. **26.** 1. 1928.
288. Lüers H. u. Moninger Wo. Wo. Br. **1935.** 385.
289. Blom J. Wo. Br. **1936.** 25; **1937.** 412.
290. Mohr. Wo. Br. **1904.** 149.
291. Lüers H., Geys K. u. Baumann A. Brauwes. **1920.** 185.
292. Mischke W. Wo. Br. **1940.** 63.
293. Krauß G. u. Harreis. F. Wo. Br. **1940.** 33.
294. Gray P. P. u. Stone J. Wallersteins Commun. **3.** Nr. 10. 1940.

295. Windisch W. u. Bermann V. Wo. Br. **1920**. 109.
296. Helm E. u. Richardt O. C. J. Inst. Brew. **1936**. 191. Ref. Wo. Br. **1936** 245
297. Helm E. u. Richardt O. C. Wo. Br. **1938**. Nr. 12.
298. Renguist. Skand. Arch. f. Physiol. **38**. 97. 1919.
299. Norris F. W. Congr. Int. d. Industr. d. Ferment Gent 1947. Confer. et. Commun. S. 110. Ref. Mitt. d. Vers. Anst. f. d. Gär. Gew. u. d. Inst. f. angew. Mikrobiol. d. Hochsch. f. Bodenkult. Wien **1948**. Nr. 1-3.
300. Jung Ö. Brauwes. **1923**. 74.
301. Fink H. Brauwelt **1948**. Heft 1. S. 1.
302. Kraut H. u. Schlottmann F. Bioch. Z. **291**. 406. 1937.
303. Fink H. Z. f. Naturforsch. **2**. b. 187. 1947; Brauwelt 1948.
304. Thomas P. Ann. Inst. Pasteur **35**. 43. 1921; Ref. Wo. Br. **1921**. 283.
305. Fodor. A. Koll. Z. **27**. 58 1920.
- 305a. J. Bayer. Dissertation Techn. Hochschule München 1919.
306. Lüers H. u. Novak G. Bioch. Z. **154**. 310. 1924.
307. Lüers H. u. Schuster K. Koll. Z. **32**. 334. 1923.

Sachverzeichnis

Abläutern	150
Alanin- β	192
Albumine	69
Albumosen	29
Aminosäuren	19
„ bei Gärung	200
„ beim Maischen	143
„ Trennung	20
Aminostickstoffbestimmung	22
Amorphe Substanz	171
Amylase	78
Anormale Gärung	211
Aromatisieren	124
Assimilation des Stickstoffs	184, 190
Atmung	116
Ausdarrungsgrad	126
Ausnützung der Gerste im Brauprozeß	239
Bierzusammensetzung	236
Bios	190
Biotin	190
Caramelmalz	129
Casein	73
Cerevesin	241
Chromoproteide	75
Darren	118
Deckenbildung	206
Degenerierung von Hefe	209
Denaturierung	16
Diketopiperazin	33
Donnangleichgewicht	56
Edestin	79
Eisentrübung	225
Eiweiß siehe auch Protein und Stickstoff	
Eiweißabbau beim Mälzen	103
Eiweißabbau beim Maischen	133, 136
Eiweißgehalt und Lösungsgrad	114
Eiweißgerbstoffverbindungen	174 u. ff.
Eiweißhydrolyse	19
Eiweißlösung und äußere Faktoren	111
Eiweißrast	144
Eiweißtrübung	216
Elektrophorese	54
Enzymatische Proteolyse	23
Ester bei Gärung	207
Farbmalz	130
Filtration	214

Formolstickstoff bei Gärung	199
" im Malz	109
Formoltitration	20
Formoltitrierbarer Stickstoff bei Maischen	138 u. ff.
Gärung	138
Gerbstoff und Eiweiß	157
Gerüstproteine	72
Gliadin	71
Globuline	69
" beim Maischen	142
Globulosen	79
Glutathion	30
Glutenin	81
" bei Keimung	107
Glycoproteide	75
Hefenucleinsäure	74 u. 243
Hefeproteine	240
Heißtrub	168
Histone	72
Hordein	71, 81
" bei Keimung	107
Hordenin	128
Höhere Alkohole bei Gärung	207
Hopfenbitterstoffe und Eiweiß	162
Hopfengerbstoff und Eiweiß	157 u. ff.
Hopfenstickstoff	161
Intensität des Maischverfahrens	146
Isoelektrischer Punkt	47
Kältetrübung	175, 217 u. ff.
Kataphorese	54
Keimreife der Gerste	92
Keimung	97
Keimungsdauer	113
Keimungstemperatur	112
Kleber	71
Koagulation	16
" beim Würzekochen	154
Koagulierbarer Stickstoff beim Darren	121
" " bei Lagerung	204
" " in Maische	148
" " beim Würzekochen	155
Kochdauer	156
Kochintensität	156
Kühlen der Würze	166
Kühltrub	170
Lagerung des Bieres	211
" " Malzes	131
Leucosin	77
Lüftung und Keimung	115

Malzkeime	126
Melanoidinmalz	129
Melanoidinreaktion beim Darren	122
„ „ Kochen	164
Membranpotentiale	56
Metalleiweißtrübung	223
Nachgüsse	153
Nebelmalze	128
Nucleinsäuren	74
Nucleoproteine	73
Oxydationstrübung	220
Pantothensäure	190
Papain	222
Pasteurisierrübung	220
Pepsin	25, 222
Peptidasen	24
„ bei Keimung	100
Peptidbindung	31
Peptone	29
pH bei Gärung	207
pH und Würzekochen	155
Phosphorproteine	73
Prolamine	71
Protamine	72
Proteasen	24
Proteasen beim Maischen	137, 141
Proteinase bei Keimung	99
Proteine siehe auch Eiweiß und Stickstoff	
„ Eigenschaften	10
„ Einteilung	68
„ elektrolytische Dissoziation	46
„ und Elektrolytwirkung	65
„ elementare Zusammensetzung	12
„ Fällungsreaktionen	12
„ Farbenreaktionen	14
„ im Gerstenkorn	85
„ Hydrolyse	19
„ im Hopfen	94
„ als Kolloidelektrolyte	56
„ Konstitution	31
„ Molekulargewicht	39
„ und Neutralsalze	60
„ osmotischer Druck	58
„ und Quellung	59
„ Säure- und Basenbindung	51
„ Viscosität	59, 62
Proteingehalt und Düngung	91
„ „ Eigenschaften des Gerstenkorns	87
„ „ Sorteneigenschaften	89
Proteinlösung, Beurteilung	108

Proteinkomplexe	63
Proteolytische Enzyme beim Darren	125
" " beim Keimen	98
Reife	114
Reife der Gerste	92
Säuerung der Maische	147
Sauerstoffaufnahme	166
Schaumhaltigkeit	226
Spelzenprotein	86
Stickstoff siehe auch Proteine und Eiweiß	
Stickstoffabgabe durch Hefe	202
Stickstoffassimilation in der Praxis	194
Stickstoff im Brauprozeß	239
Stickstoffdifferenzierung	82, 108, 135
" bei Gärung	196
Stickstoffernährung der Hefe	184
Stickstoff und Gärleistung	193
Stickstoff und Hefe	183
Stickstoffverbindungen beim Darren	118
Stickstoffverteilung im Malz	116
Treber	153
Trubabscheidung	167
Trubzusammensetzung	169
Trypsin	26
Ultrazentrifuge	40
Vitamine im Brauprozeß	238
Vollmundigkeit	235
Weiche	96
Weichgrad	115
Wildwerden der Biere	234
Wuchsstoffe	189
Würzekochen	154
Würzezusammensetzung	181
Zinntrübung	224
Zymocasein	73, 241





C. F.

 Acc. No. 2
 Call No. F

 Please

Call No. ~~F85.32962; 91~~ 113H9

Call No. ~~F85.32962; 91~~ 113H9

Please return this publication on or before the last **DUE DATE** stamped below to avoid incurring overdue charges.

P. No.	Due date	Return date

2896
Die proteine im...

2896

Die proteine im,



THE
LIBRARY
OF THE
MUSEUM
OF
COMPARATIVE ZOOLOGY
AND
ANATOMY
HARVARD UNIVERSITY

